

**TÖREKVÉSEK A TERHESSÉGI ARÁNY
NÖVELÉSÉRE AZ IN VITRO FERTILIZÁCIÓ
SORÁN**

ÚJ BIOLÓGIAI ÉS TECHNIKAI ELJÁRÁSOK

Írta: Kanyó Katalin

Programvezető: Dr. Szabó István egyetemi tanár, a MTA Doktora

PTE ÁOK

**Doktori (PhD) értekezés
2003.**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések.....	3
I. Bevezetés – Az IVF története	4
II. Célkitűzések és kérdésfelvetés.....	8
III. Vizsgálatok.....	10
A. A lézer asszisztált hatching	10
A.1. Irodalmi áttekintés.....	10
A.2. Anyag és módszer	17
2.a. A lézer fizikai hatásai	17
2.b. LAH indikációja	17
2.c. Szövettenyésztés + LAH	18
2.d. Mechanikus hatching (PZD).....	21
2.e. Vizsgálati irányok és csoportok.....	21
α. LAH utáni eredmények vizsgálata	21
β. Lézer és mechanikus hatching eredményeinek összehasonlítása.....	22
γ. LAH után született első 134 gyermek nyomonkövetéses vizsgálata	22
A.3. Eredmények	23
α. LAH végzése utáni eredmények vizsgálata	23
β. LAH és PZD eredményeinek összehasonlítása.....	26
γ. LAH után született első 134 gyermek nyomonkövetéses vizsgálata	28
A.4. Megbeszélés	35
B. A blasztociszta kultúra	37
B.1. Irodalmi áttekintés.....	37
B.2. Anyag és módszer	55
B.3. Eredmények	66
B.4. Megbeszélés	68
IV. Gyakorlati következtetések	69
A. A lézer asszisztált hatching	69
B. A blasztociszta kultúra	70
V./A. Irodalomjegyzék.....	71
V./B. A témához kapcsolódó tudományos tevékenység jegyzéke	85

RÖVIDÍTÉSEK a megjelenés sorrendjében

IVF	In Vitro Fertilisatio
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection
GIFT	Gameta Intrafallopian Transfer
ZIFT	Zygote Intrafallopian Transfer
TET	Tubal Embryo Transfer
HIC	High Insemination Concentration
HTFL	Human Tubal Fluidum
LAH	Laser Assisted Hatching
ET	Embryo transfer
IVF-ET	In Vitro Fertilisatio - Embryo transfer
ZP	Zona pellucida
AH	Assisted hatching
TEP	Trophectoderm Projections
PZD	Partial Zona Dissection
ICM	Inner Cell Mass

I. BEVEZETÉS

AZ IN VITRO FERTILIZÁCIÓ TÖRTÉNETE

Az orvostudomány és a biológia új eredményeiről, felfedezéseiről, mind a szakma, mind pedig az érdeklődők gyakran a média segítségével értesülnek, nem pedig a szakmai folyóiratokból. Így történt ez az in vitro fertilizáció (IVF) esetében is. 1978-ban a Nature című folyóirat tudatta a világgal, hogy megszületett az első lombikbébi (Steptoe és Edwards, 1978) Angliában. A szenzációs bejelentés időpontját tekintik a világon az asszisztált reprodukciós beavatkozások kezdetének, pedig ezt az eredményt évtizedekig tartó, fáradságos kutatómunka és kísérletezés előzte meg. Louise Brown megszületése mégis az egyik legnagyobb eseménye volt a humán, szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítés történetének. Ezt követték Ausztráliában, Melbourne-ben 1980 júniusában, az USA-ban, Norfolkban 1981. decemberében megszületett lombikbébik.

A kezdete és előzményei azonban sokkal korábbra tehetők. Schenknek (Schenk, 1880) Bécsben sikerült megtermékenyítenie tengerimalac és nyúl petesejteket és ezek osztódását is sikerült megfigyelnie. 1891-ben Heape sikeres embriótranszfert végzett nyulaknál (Heape, 1891), ahol is az embriókat a petevezető átmosásával nyerte. Heape munkássága hívta fel a kutatók figyelmét az embriók laboratóriumi tenyésztésének lehetőségére.

Korai embrió fejlődésének tanulmányozása szintén nagyban hozzájárult a szakterület fejlődéséhez.

Az első humán kísérletek több, mint 60 év múlva történtek. Rock és Menkin (Rock, 1944) emberi petesejteket inszemináltak in vitro és az embriók első osztódását is meg tudták figyelni kétsejtes állapotban. De Kretznek (De Kretz, 1973) Ausztráliában már sikerült szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítéssel embernél terhességet létrehozni, de ez spontán vetéléssel végződött.

Steptoe és Edwards gyümölcsöző együttműködése 1968-ban kezdődött Londonban a Royal Society of Medicine tudományos ülésén, ahol Steptoe a petefészek és tüszők laparoszkópos felvételeit mutatta be. Ezt az előadást Robert Edwards fiziológus is meghallgatta, aki az előadás után beszélgetésbe elegyedett az előadóval. Felvetette azt, hogy ha Steptoe laparoszkóp segítségével petesejtet tudna nyerni, azt ő megpróbálná megtermékenyíteni.

A világstatisztika szerint napjainkban több, mint 200 000 az in vitro fertilizáció segítségével megszületett gyermekek száma. Ma már a világ legtöbb országában végeznek lombikbébi programot. Európában 18 ország statisztikája alapján 1997-ben több, mint 200 000 petesejtnyerés történt, amelynek eredményeként 26,1% klinikai terhességi arány jött létre IVF-el és 26,4% Intracytoplasmic Sperm Injection-val (ICSI). A „take home baby” arány IVF-re 20,9%, ICSI-re 21,5% volt az ESHRE statisztikája alapján. Az átlagos ikerterhesség aránya 29,6%, amelyből 25,8 % kettős iker, 3,6% pedig hármas iker, 0,2% a négyes iker terhesség volt.

Az összes születésszám kb. 2,5-3,5%-a az IVF eredménye.

Ezen adatok egyértelműen alátámasztják, hogy a szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítés az egész világon elterjedt, rutinszerű orvosi beavatkozássá vált. Az IVF azonban nem tekinthető kizárólag orvosi beavatkozásnak, gyakorlatilag több tudományág bizonyos részeit összesíti, így a biológia, genetika, molekuláris genetika egyes területeit.

Kezdetben az IVF csak a tubáris eredetű meddőség esetén volt alkalmazható. Későbbiekben a beavatkozás indikációs területe folyamatosan bővült. Megpróbálták a módszert alkalmazni

immunológiai, anovulációs eredetű infertilitásnál és endometriosis externánál.

Például az ismeretlen eredetű meddőségben szenvedő párok kezelésére vezette be Asch (Asch, 1984) a Gameta Intrafallopian Transfer-t (GIFT), amikor a petesejteket és a spermiumokat egyidejűleg a petevezető ampulláris részébe juttatta laparoszkóp segítségével, ami bizonyos esetekben az in vitro fertilizáció alternatíváját jelentheti. Ezt a módszert a későbbiekben transzcervikálisan, hasi ultrahang ellenőrzés mellett végezték (Jansen és mtsai 1987; Szilágyi és mtsai, 1995). Devroey (Devroey, 1986) a már osztódó embriókat a petevezetőbe juttatta laparoszkóppal (Zygote Intrafallopian Transfer, ZIFT), aminek segítségével az embriók természetes körülmények között fejlődhetnek. Jansen és munkatársai (Jansen, 1988) már laparoszkóp használata nélkül, transzcervikálisan juttatták az embriókat a petevezetőbe katéterezéssel (Tubal Emryo Transfer, TET).

A kilencvenes évek kezdetétől egyre több próbálkozás történt, hogy a szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítés módszerét kiterjesszék a férfi eredetű infertilitás eseteire is. A kérdés fontosságát az húzza alá, hogy az infertilis házasságok és párkapcsolatok közel felében a spermatogenezis, spermium transzport tehető felelőssé a gyermektelenségért.

Amennyiben a spermiumok minősége és mennyisége nem volt megfelelő, illetve immunológiai pozitivitás esetén, a tradicionális IVF sikertelen volt, hiába próbálkoztak meg a spermium koncentrációjának növelésével (HIC), vagy a férfi partner hónapokig tartó injekciós kezelésével.

Az igazi áttörést az jelentette, amikor a spermiumot mikromanipulációval juttatták a petesejt különböző részeibe (Laws-King és mtsai, 1987, Lanzendorf és mtsai, 1988) váltakozó eredményességgel. Palermo és mtsai (Palermo, 1992) ismerték fel, hogy a spermiumot mozgásában gátolni kell a beavatkozás előtt. A farki részt borító hártya sérülésével enzim aktiváció érhető el és az így előkészített spermiumot kell a zona pellucidán keresztül bejuttatni a petesejt citoplazmájába. Az eljárás módosítása átütő sikerrel járt. A világon széles körben elterjedt, új módszer neve ICSI. A módszer rendkívüli eredményessége miatt napjainkban a szervezeten kívüli

mesterséges megtermékenyítés 60-70%-a ICSI-vel történik és 30-40%-a csak a tradicionális IVF.

Későbbiekben a szövettenyésztés során az embriológusok azt is megfigyelték, hogy a fejlődő embrió számára a petevezető folyadék Human Tubal Fluidum (HTFL), előnyösebb környezetet jelent, mint a mesterségesen megalkotott táptalajok (Bongso és mtsai, 1992). 1978-tól a kilencvenes évek elejéig az embriókat a petesejt vételtől számított először két, majd három napig tenyésztették, maximum hat – nyolc sejt állapotig. Természetes körülmények között az embrió, a petevezetőben vándorol és osztódik, majd öt – hét napos korban kerül a méhüregbe és implantálódik a méh nyálkahártyájába. Az IVF eredményeinek javítása érdekében állandó törekvés a szakemberek számára, hogy az embriókat öt – hét napos korban, blasztocisza stádiumban helyezték a méhüregbe.

A kokultúrák (Bongso és mtsai, 1994; Menezo és mtsai, 1990) és későbbiekben a szekvenciális táptalajok (Gardner 1998/a) alkalmazása, már lehetővé tette a blasztocisza állapotban történő embriótranszfert.

Lehetővé tette és egyszerűsítette a petefészek stimulációjának ellenőrzését és a fejlődő tüszők leszívását a petesejt aspirációt a transzvaginális ultrahang technika (Lenz és mtsai, 1987), ezen gyors és egyszerű módszer kiszorította a laparoszkópiás petesejt nyerést.

Fontos előrelépést jelentett a petefészek stimuláció területén olyan új gyógyszerek bevezetése, aminek segítségével több és jobb minőségű petesejt állt rendelkezésre a szövettenyésztés céljaira. A GnRH analógok alkalmazása (Fleming és mtsai, 1982, Porter és mtsai, 1984) és a tisztított urin-FSH készítmények megjelenése, majd a rekombináns géntechnológiával előállított, igen nagy tisztaságú gyógyszerek megjelenése a kontrollált petefészek stimulációt és így az IVF-programok eredményességét fokozza.

II. CÉLKITŰZÉSEK – KÉRDÉSFELVETÉS

A Szent János Kórházban, a Budai Meddőségi és In Vitro Fertilizációs Centrum 1992. augusztus 11-e óta folyamatosan működik. A Centrum nemcsak IVF-fel, hanem az infertilitás okainak kivizsgálásával és kezelésével foglalkozik a modern asszisztált reprodukciós technikák széles skálájának alkalmazásával. Az elmúlt kilenc év alatt 3210 IVF-s ciklusból 970 klinikai terhesség jött létre (30,2%), ebből 706 esetben élveszülés zajlott le (22%), melynek eredményeképpen 918 gyermek született meg (a többesterhességek 30%-s előfordulásának gyakorisága miatt).

Az értekezésben kidolgozott témák az asszisztált reprodukció embriológiai oldalának terén végzett mindennapos gyakorlati tevékenység során felvetődött problémákból adódtak, amelyek a következők voltak:

1. Bár az IVF-s kezelések terhességi aránya elérheti egy kezelési ciklus után a 30%-os sikerarányt és a 20-25%-os „take home baby” arányt, ennek ellenére a kumulatív terhességi arány ötszöri beavatkozás után sem éri el a 70 %-t. Ennek oka, a 35-40 év feletti, relatívan magas női kor és az úgynevezett „poor responderok” magas aránya az IVF-s párok között, ami azt jelenti, hogy ezen betegcsoportban kevés és váltakozó, - gyakran rossz minőségű petesejt nyerhető csak, ami csökkenti, vagy lehetetlenné teszi terhesség elérésének esélyét.
2. A szövettenyésztés második, harmadik napján végzett embrió transzfer esetén a négy-nyolc sejtes embriók közül kell kiválasztani morfológiai kritériumok alapján a behelyezésre kerülőket. Ebben az időben még nem tudjuk megmondani, hogy melyek az igazán életképes préembriók, amelyek a méhüregben tovább osztódnak és beágyazódásra kerülhetnek, mivel ebben az időszakban az embriók 50%-a osztódási blokk miatt nem folytatja a fejlődést.

3. Jól ismert tény, hogy természetes körülmények között a petevezetőben megtermékenyült petesejtek, majd embriók öt nap vándorlás után, mialatt folyamatosan osztódnak, a ciklus 20-21. napján úgynevezett blasztocisza állapotban kerülnek a méhüregbe, ahol ideális esetben a beágyazódás történik. Erre az időszakra az endometrium felkészült az embrió befogadására, úgynevezett midluteális fázisban van. A blasztocisza állapotnak a nyálkahártya midluteális fázisa felel meg, ekkor van szinkronban az embrió és endometrium fejlettsége.
A második és harmadik napon végzett transzfernél a nyálkahártya igazából még nem fejlett eléggé az embrió befogadására, vagyis aszinkronitás áll fent az embrió és az endometrium fejlettségi állapota között.
4. Jól ismert tény, hogy a petesejt aspiráció után két, három nappal a méh kontrakció készsége fokozott, tehát az ebben az időszakban végzett embrió behelyezésnél az embrió kilökődésének kockázata is fokozott. Később azonban ez a görcskésztség csökken és így az úgynevezett késői embrió transzfer esetén kevesebb kontrakció váltódik ki és ezáltal növekszik az implantáció esélye.

Vizsgálataim folyamán ezen problémák megoldásának céljából két alapvető kérdésre kerestem a választ.

- A. Lézer asszisztált hatchinggel (LAH) fokozható-e a terhességi sikerarány, a magasabb női kor, a többszöri sikertelen IVF-ET, emelkedett bazális FSH érték, vastag zona pellucida (ZP) esetén? Biztonságosan alkalmazható-e a LAH? Milyen hatással van a LAH alkalmazása az utódok egészségi állapotára ?
- B. Jelent-e előrelépést az úgynevezett öt napos, blasztocisza transzfer alkalmazása az IVF mindennapi gyakorlatában? Milyen esetben és milyen gyakorisággal alkalmazható a blasztocisza kultúra ?
Növeli-e a blasztocisza tenyésztés az implantációs arányt? Mennyiben befolyásolja a módszer a terhességi arányt?

III. VIZSGÁLATOK

III.A. LÉZER ASSZISZTÁLT HATCHING (LAH)

III.A.1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A ZP, a petesejtet borító hártya, amely különböző feladatokat lát el. A zona pellucida fajspecifikus. A spermiumok számára akadályt, de egyben kötődési egységet (receptor) is jelent. A megtermékenyülés után a ZP szolgáltatja a legfőbb gátat a polispermia, a többszörös megtermékenyítés ellen. A ZP védelmet nyújt ugyanakkor a fehérvérsejtek bejutása ellen és a bakteriális, illetve gombás fertőzésekkel szemben. Ezen kívül a sérülékeny petesejtet és embriót megvédi a környezet fizikai ártalmaitól. A ZP megelőzi a blasztomerek szétesését, összetartja az osztódó embriót. A hatching (mely a zona pellucida meghasadását és a blasztomerek kijutását jelenti) pontos mechanizmusa még nem ismert, azonban néhány jól meghatározható lépést ezzel kapcsolatban már leírtak. A hatchinget két fontos vonással, vagy fiziokémiai folyamattal jellemezhetjük: egyrészt a ZP lízise, melyet maga az embrió hoz létre. A másik jellemzője a hatchingnek a hidrosztatikai nyomás, melyet a blasztomerek számának megtöbbszöröződése, az üregrendszer kialakulása, így a blasztocisza térfogatának méretbeli növekedése fejt ki a ZP-ra.

A ZP „hatchingje” az egyik lehetőség az implantáció javítására. Cohen és munkatársai (Cohen, 1992) vizsgálatai szerint, az asszisztált hatchig (AH) végzése a 38 évnél idősebb pácienseknél a leghatásosabb és azoknál, akik emelkedett bazális FSH szinttel rendelkeztek, míg azon páciensek esetében, akiknél az embrió ZP-a vékony, ez a módszer kockázatos lehet. Schiewe (Schiewe 1995/a) tanulmányozta a meg nem termékenyült és abnormális embriók ZP-jának jellemzőit, ezen belül is a ZP megkeményedését, ahol is megvizsgálta a kapcsolatot a szövettenyésztés időtartamával, a beteg életkorával és a ZP vastagságával. Nem találtak összefüggést a ZP

keményisége vagy vastagsága és a beteg életkora között. A kapott adatok nem támasztották alá azt az elképzelést, hogy extra ZP keményedés történik a kiterjesztett kultúrák alatt. Gonzales (Gonzales, 1996) rámutatott, hogy a trophoctoderma projections-nak (TEP) valószínűleg szerepe van az embrió és a méh nyálkahártya összekapcsolódásában, az implantációban és az embrió helyváltoztatásában. Schiwe (Schiwe 1995/b) kifejtette a ZP lizinjeinek befolyását a hatching mechanizmusában és megmutatta, hogy a trophoctoderma sejtek a felelősek a ZP lizinjeinek kiválasztásáért, mely a hatchinghez szükséges. Adatokkal lehet alátámasztani, miszerint az in vitro hatching a kellően nagy számú sejtektől függ. Khalifa és mtsai (Khalifa, 1992) kimutatták, hogy a ZP vékonyodás szignifikánsan megnöveli az egérembrió teljes hatchingjét. Liu és mtsai (Liu, 1993) megfigyelték, hogy az embrió implantációja jóval hamarabb ment végbe azoknál, akiknek az embrióin AH-t végeznek, valószínűleg ez korai embrió méh nyálkahártya kontaktust tesz lehetővé.

A ZP megnyitására a legrégebben alkalmazott a mechanikus módszer, az úgynevezett parciális zóna disszekció (PZD). Ezt az eljárást Cohen és mtsai 1990-ben (Cohen, 1990) fejlesztették ki.

A második megnyitási módszer a kémiai, vagy vegyszerrel végzett hatching, melyhez tiródsav oldatot használnak, mellyel a pH értéket úgy állítják be, hogy az átlukassza a zóna teljes vastagságát, vagy elvékonyítsa azt, eltávolítva a külső rétegét. Ezt Gordon és Talansky (Gordon and Talansky, 1986; Gordon, 1993) vezette be. Ezen módszer alkalmazásakor azonban, az embrió túlságosan hosszú ideig van kitéve a környezeti hatásoknak (pl. a mikromanipulátorok használata) és a savas tiród oldat mérgező az embrió számára.

A legújabb megnyitási módszer a LAH (Godke és mtsai, 1990, Tadir és mtsai, 1991, Strohmer és mtsai, 1992, Obruca és mtsai, 1994, Antinori és mtsai, 1995, Germond és mtsai, 1995).

Manapság a lézer rendszerek ígérnek a legbiztosabb technikai megoldást az IVF-s kezelések területén.

Az LAH gyorsan tért hódított 1988 nyara óta. Tadir (Tadir, 1989, 1991) írta le először a lézer technika alkalmazását asszisztált reprodukció esetén, Palanker (Palanker, 1991) pedig a ZP megnyitásában. Obruca (Obruca, 1997) egy tanulmányában elemezte az Er: YAG lézer a ZP ultraszerkezetére gyakorolt hatását. Semmiféle degeneratív hatást nem találtak fény és elektronmikroszkóppal végzett vizsgálataik során.

A lézersugár alkalmazási lehetőségei egyre bővülnek a mikromanipuláció területén. Fizikai értelemben, nem érintkezik a lézersugár a sejtekkel, nincs semmiféle mérgező hatása a sejtekre és könnyen kezelhető. A lézertechnika bevezetése különböző új lehetőségeknek adott teret, mellyel gyors és hatékony beavatkozásokra van lehetőség.

A lézerek (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), olyan rendszerek, amelyek különleges tulajdonságokkal rendelkező elektromágneses hullámokat bocsátanak ki. A lézersugár fő jellemzője, hogy kollimált, monokromatikus és koherens. A lézerek különböző hullámhosszúságúak lehetnek, melyek a látható (vörös, zöld, kék), a nem-látható ultraibolya (UV), illetve infravörös (IR) tartományra tagolódnak. A lézer és más fényt alkalmazó rendszereknek több kritériumnak kell megfelelni: érintkezés-mentes módját kell megvalósítani annak, hogy a lézerfény eljusson a célponthoz, lehetőleg minimális elnyeléssel. Könnyen kell tudni csatlakoztatni a különböző típusú mikroszkópokhoz. Alapvetően fontos, hogy olyan eszköz legyen a kezünkben, amely az egész folyamatot nagyon pontosan szabályozza és nem okoz mechanikai, termikus illetve mutagenetikus mellékhatást. A műszerre jellemző paraméterek és alkalmazásuknak módjai befolyásolják az elérhető hatást.

A behatási idő változtatásával lehet a keletkezett hőhatást beállítani. Minél hosszabb ez az idő, annál több hő keletkezik.

A létrejövő lyuk átmérője az idő logaritmusával (ms-ban), azaz az összesen beérkező energia logaritmusával arányosan nő. A lézerek alapvonása, hogy egy kisméretű területre koncentrálódnak, melynek mérete 1 és 5 μm közötti lehet.

Ez a módszer lehetővé teszi, hogy különböző határozott élekkel rendelkező lyukat hozzunk létre az időtől (3 és 100 ms között) és a lézer teljesítményétől (22 - 55 mW) függően.

Kétféle lézerrendszert használnak jelenleg:

a/ non-kontakt lézer: a lézert közvetlenül a célpontra irányítják szabad lézersugárként, tangenciálisan

b/ kontakt-lézer: hajlékony kvarc szálakat alkalmaznak, mint sugárforrást és ezzel érnek hozzá a sejthez.

Mostanában igen gyakran mikroszkópba építenek be lézereket, megkönnyítve ezzel használatukat. Ezek nagyon pontos és többször használható vágóeszközök. Ez a technika könnyen alkalmazható, jól nyomomonkövethető és messzemenően kontrollálható.

Az 1.48 μm -es dióda lézer különösen alkalmasnak bizonyult arra, hogy átvegye a konvencionális mechanikai és kémiai módszerek szerepét a ZP megnyitásában az AH során (I. táblázat)

1990-ben J. Cohen (Cohen, 1990) vezette be az AH-t a klinikai gyakorlatba, hogy növelje az implantációs arányt, amikor az embrió vastag ZP-vel rendelkező (15 μm -nél nagyobb) vagy 38 évnél idősebb betegek esetében (Mátyás, 1997). A 1.48 μm -es dióda lézer előnye a többivel szemben, hogy a kibocsátott fény teljesítménye elégséges ahhoz, hogy egy adott méretű lyukat tudjunk nyitni a ZP-n, igen nagy pontossággal.

Paraméterek	
Típus	1.48 μm Dióda Lézer
Hullámhossz (nm)	1480
Impulzus időtartama	5×10^{-3}
Lyuk mérete (μm)	8
Irradiáció (μm)	9.4×10^4
Impulzusok száma	1
Összenergia (joules)	2.4×10^4

I. táblázat. Az 1.48 μm dióda lézer technikai adatai

A kollimált fénnel rendelkező, 1.48 μm -es folytonos lézernyalábot több tükrön keresztül a mikroszkópba vezetik és az objektív (45x) segítségével egy kisméretű, kör alakú területre koncentrálják, melynek átmérője 1 és 3 μm között van. A maximális teljesítmény 55 mW, melyet az objektív képsíkjában érik el, ez egy maximum 1.76 mW/cm^2 –es teljesítmény- sűrűséggel egyenértékű. Noha a lézer több részből áll, dióda, elektronikus vezérlőből és lencséből, mégis aránylag kis méretű, így alkalmas arra, hogy egy mikroszkópba belehelyezzék. Ez a rendszer megvalósítja az érintkezés-mentes eljuttatást a célpontra.

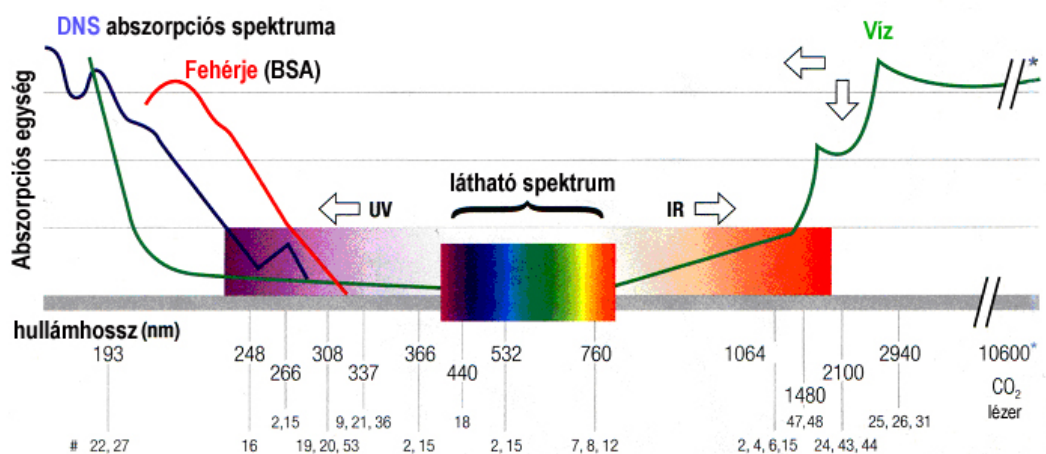
Ezeknek az infravörös lézereknek elsőbbséget kellene kapniuk a többiekhez képest, mivel ezt a lézernyalábot nem nyeli el a szövettenyészto edény és a víztartalmú közeg (a táptalaj).

Tadir (Tadir, 1998) vizsgálta meg az impulzus időtartamának és az impulzus gyakoriságának hatását. Megállapította, hogy az impulzus energiája és a nyaláb fókuszsjának helyzete voltak a legkritikusabb paraméterek a létrejött kör alakú lyuk átmérőjét illetően.

Malter és munkatársai (Malter, 2001) találtak különbséget, akkor ha többszörös impulzust, illetve egyszeri impulzust alkalmaztak a nyílás létrehozásához. Az egyszeri impulzussal nem tudtak megfelelő mértékű pontossággal dolgozni, amely ahhoz kellett, hogy a lyuk mérete, alakja, helyzete pontosan befolyásolható legyen. Nagyon nehéz magyarázatot adni erre a jelenségre, vagyis, hogy többszöri, kisebb teljesítményű impulzusok hogyan hozhatnak létre alapvetően más hatásokat mint egy egyszeri, de hosszabb időtartamú, erőteljesebb impulzus, mivel eközben a teljes behatási idő és a ZP megnyitásának mértéke nagyon hasonló marad.

Az eredmények arra utalnak, hogy az embriók nem szenvednek hőkárosodást. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a lézeres behatás időtartamát és körülményeit úgy választottuk meg, hogy a lyuk létrehozásához a lehető legkisebb időt használtuk fel, mely minimális termikus behatással jár együtt (teljesítmény 47 mW, impulzus arány < 15 ms).

Meg kell jegyezzük, hogy a DNS fényelnyelése függ a hullámhossztól (a DNS abszorpciós spektruma minimum 300 nm körüli) (1. kép). Az LAH alkalmazásakor alapvetően fontos, hogy a rendelkezésre álló lézer rendszerek közül a legjobbat válasszuk ki az eljáráshoz. Az intézetünk által felmutatható eredmények elérésében nagy szerepet játszik a megfelelő lézer kiválasztása és alkalmazása.



1. kép Fény abszorpció

Malter és munkatársai (Malter, 2001) kísérleteket végeztek, amelyben különböző lézer rendszerek hatásait hasonlították össze az általunk is használt ún. Fertilase lézerrel. A kísérletek eredményei a következők voltak: azok az embriók, melyeket más cég által gyártott lézerrendszer segítségével hasítottak meg rosszabb fejlődési arányt mutattak, itt csak 42%-os volt a tenyésztés negyedik napjára az üreg kialakulás (cavitatio) aránya, míg a Fertilase lézer alkalmazása esetében ez 64% volt. Ebben a kísérletben a nem üregesedett morulákat, ha még szigorúbb értékelésnek vetették alá a negyedik napon akkor még magasabb eltérési arányt találtak (58%) a blasztomerek kompaktálódását vizsgálva. Az implantációs arány (64 vs 78%) és az élő magzatok aránya (38 vs 64%), ami előnyösebb paramétereket mutatott a Fertilase lézer alkalmazása esetében.

A.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A.2.a. A LÉZER FIZIKAI HATÁSAI

A Szent János Kórház Budai Meddőségi Centrumában az AH-t non-contact módon, 670 nm-es, 1.48 μm -es, infravörös dioda lézer (Fertilase , MTM, Svájc) segítségével végezzük (2. kép).

Az infravörös dióda lézer a mikroszkóp objektívén keresztül fókuszálódik és ennek segítségével tudunk létrehozni a ZP-n megfelelő méretű lyukat. Ez az úgynevezett drilling hatás a ZP glikoprotein mátrixának, nagymértékben lokalizált szétszakadásának az eredményeként jön létre, amelyet a hőhatás okoz (Rink, 1996), miközben ionizáció nem történik.

Ez a módszer teljesen különbözik a fotoablációtól, melyet az ultraibolya tartományhoz közeli hullámhosszok hoznak létre (Neev és mtsai, 1992). Az érintőleges lézer besugárzásnak köszönhetően alagútszerű lyuk jön létre (átmérő 4.5 – 20 μm , az optimális lézer teljesítmény 47 mW). A lyuk mérete besugárzás idejétől és az energiától függ, ez 20-30 ms emberi embrió esetén.

Az infravörös tartományban végrehajtott LAH nem befolyásolja az embrió túlélését (Antinori, 1994,1996, Germond , 1995, Rink,1996, Konc, 2000, Kanyó, 1999, 2000, 2002).

A.2.b. LAH INDIKÁCIÓJA

A LAH indikációs területe a következő volt: az életkor (több mint 35 év) és / vagy korábban végrehajtott, legalább 3 sikertelen IVF-ET.

A Szent János Kórház Budai Meddőségi Centrumában 1998. február 28-án indítottuk el non-contact lézerrel végzett AH.

A.2.c. SZÖVETTENYÉSZTÉS + LAH

A pároknál rutinszerű IVF-et programot végeztünk, amelyet tradicionális IVF, vagy ICSI követett. A petesejteket, zigótákat és embriókat standard körülmények közt kezeltük. A megtermékenyítést követően 18-24 óra elteltével értékeltük a fertilizációt. Ezután a megtermékenyült zigótákat Petri csészébe (Falcon, 3001, USA) helyeztük, amelyben Medicult (IVF) vagy Scandinavian Science IVF-100 táptalaj 50 µl-s cseppjei voltak, s ezt 500 µl ásványi olajjal (Sigma) fedtük le.

Az LAH-t a második napon hajtottuk végre, amikor az embriók a 2-3-4-5-6 sejtjes állapotban voltak (3-4. kép). A 670 nm-es dióda és a kollimált 1.48 µm-es lézersugarakat az invert mikroszkópba tükrrendszeren keresztül jutott, amit a mikroszkóp 10 µm átmérőjű, köralakú területre koncentrált. Általában így az objektív képsíkjában 47 mW teljesítmény érhető el. A ZP-t 10-15 ms-os lézersugár hatásnak tettük ki. A lyuk átmérőjének mérete 5-10 µm között változott az időtől és a táptalaj hőmérsékletétől függően.

Átlagosan 2, maximum 3 lövést hajtottunk végre. Mivel a sejt fixálására nincs szükség ezért, sem mikromanipulátorra sem pipettákra nincs szükség. Bármilyen manapság elterjedt szövettenyésztő edény és táptalaj használható a beavatkozás alatt. A ZP átlyukasztása egy µm pontossággal végezhető. A behatás időtartama 40-90 msec-t vesz igénybe. Az embrió transzfert 24 órával később, a harmadik napon végeztük el, az embriók mikroszkópos ellenőrzése után (5. kép).



2. kép Fertilase lézer rendszer



3. kép 2 napos embrió LAH után



4. kép 3. napra továbbfejlődött embrió LAH után



5. kép 3. napra továbbfejlődött embrió LAH után

A.2.d. MECHANIKUS HATCHING (PZD)

Ehhez a módszerhez elengedhetetlenül fontos mikromanipulátorok használata. Mielőtt megkezdődne a beavatkozás, le kell tisztítani teljesen az embriót a korona sejtektől. Az embriókat HEPES tartalmú táptalajba, mikrocseppbe helyezzük, majd az egészet lefedjük paraffin olajjal. A szövettenyésztő edényt a 37°C-ra termosztált invert mikroszkóp tárgyasztalra helyezzük. Az embriót megfogjuk a tartó pipettával, a vele ellentétes oldalon lévő speciális PZD pipettával, mely igen vékony és hegyes, átszűrjük a ZP-t egy vagy öt óra irányából indulva 2 pontban, úgy, hogy a blasztoméretet mindenképpen elkerüljük. A tartó pipetta fogását megszüntetjük és a PZD pipettára felszúrt embriót többször óvatosan a tartó pipetta alsó, vagy felső részéhez súroljuk. Mindaddig végezzük a beavatkozást, a felszúrt két pont között, míg nem látszik a ZP elvékonyodása.

A.2.e. VIZSGÁLATI IRÁNYOK ÉS CSOPORT

A.2.e.a. LAH utáni eredmények vizsgálata

A Szent János Kórház Budai Meddőségi Centrumjában 1998 február 28. és 2000 szeptember 10. közötti időszakban 1482 IVF beavatkozás történt, melyből 655 esetben az IVF-t nem követte AH -indikáció hiányában, 827 esetben viszont a program kiegészült LAH-al.

Megvizsgáltuk a klinikai terhességek arányát az embrió transzferre. Monitorizáltuk a transzferált embriókra vonatkoztatott implantációs arányt. Megnéztük a spontán abortuszok számának alakulását, valamint az élveszületési, un. „take home baby“ arányt.

A LAH csoport eredményeit tovább bontottuk indikációs alcsoportok szerint. A beosztás a következő: az 1. alcsoport: 3 vagy annál több sikertelen IVF program után lévő páciensek, de 35 év alatti női kor, a 2. alcsoport: 35 év feletti nő életkor, 3. alcsoport: 35 év feletti női életkor és 3 vagy annál több sikertelen IVF program.

A.2.e.β. LAH és PZD eredményeinek összehasonlítása

Ezen időszakban történt LAH után elért terhességek és megszületett gyermekek arányát összehasonlítottuk egy korábbi időszakban (1996. április 1. és 1999. február 27) végzett PZD eredményességével (114 eset).

Megvizsgáltuk a klinikai terhességek arányát az embrió transzferre és petesejt levételre.

Monitorizáltuk a transzferált embriókra vonatkoztatott implantációs arányt. Megnéztük a spontán abortuszok számának alakulását, valamint az élveszületési, „take home baby” arányt.

A.2.e.γ. LAH után megszületett gyermekek nyomonkövetéses vizsgálata

A későbbiekben nemcsak a terhességi sikerarányt vizsgáltuk a lézer beavatkozás után, hanem a megszületett gyermekek egészségi állapotát is folyamatosan követtük. Ez a vizsgálat felöleli (1998. december 2. és 1999. december 31. között) 96 szülésből származó 134 gyermek utánkövetéses vizsgálatát is.

Megnéztük, hogy hányszor történt prénatalis kariotípus meghatározás és milyen eredménnyel. Feltártuk a családi anamnézist, vagy az ismert kromoszóma aberráció hordozást dokumentáltuk. A perinatális adatok közül feldolgoztuk a gesztációs kort, a születési súlyt (4-6. ábra), a szex arányt, a minor és major rendellenességek meglétét, illetve hiányát és a neonatális problémákat. A vizsgálatot kiterjesztettük a gyermekek egy éves életkoráig. Összehasonlítottuk a lézeres csoport fejlődési rendellenességeinek arányát a normál koncepció során létrejött terhességekével.

A terhességeket a 16. hétig a Budai Meddőségi Centrum orvosai gondozták. A szülések húsz különböző kórházban zajlottak le, de fele (48 eset) a Szent János Kórházban történt. Minden szülésről a szülészeti intézet által kiadott anyai zárójelentést és az újszülött/ek írásbeli dokumentációját begyűjtöttük.

Majd három, hat hónapos és egy éves korban telefon interjút kértünk a szülőktől a gyermekek fejlődésére és esetleges problémáira vonatkozóan. Erre standard kérdőívet alkalmaztunk.

A major malformációnak a beteg életkilátásait, életminőségét jelentősen érintő állapotokat nevezzük (Papp, 1995).

A minor malformáció ezzel szemben az élettel összeegyeztethető eltérés.

A.3. EREDMÉNYEK

3.α LAH végzése utáni eredmények vizsgálata

A vizsgált időszakban 1482 IVF ciklust végeztünk a Szent János Kórház Budai Meddőségi Központjában. Ebből 655 történt LAH végzése nélkül és 827 pedig LAH-al kiegészített programban.

243 terhesség jött létre (37 %) a 655 esetből, ahol nem történt LAH. 80 (32,9 %) spontán abortusz zajlott le a létrejött terhességekből. Az implantációs arányt 19,9 %-nak találtuk. Szülés 163 esetben történt, a „take home baby” arány 24,9 %. A páciensek átlagos életkora 33,1 év (21-35).

A LAH csoportban 263 terhesség jött létre, ami 31,8 %. 96 terhesség (36,5 %) spontán abortusszal végződött. A 167 szülés 20,2 % „take home baby” arányt jelent. Az átlagos életkor a vizsgált csoportban 33,3 év. A beültetett embriók átlagos száma 2,8. A beültetett embriókra vonatkoztatott implantációs arány 15,2 %.

A megtermékenyülési arány mindkét csoportban azonos volt (65 % zigóta/petesejt).

Az 1. alcsoportnál, ahol a LAH indikációja 3, vagy annál több sikertelen IVF, de 35 év alatti női kor volt, 489 IVF/ICSI – ET programot végeztünk, ez az összes esetszám 59,1 %-a (489/827). Átlagosan 7, 3 petesejtet aspiráltak, melynek 66 %-a termékenyült

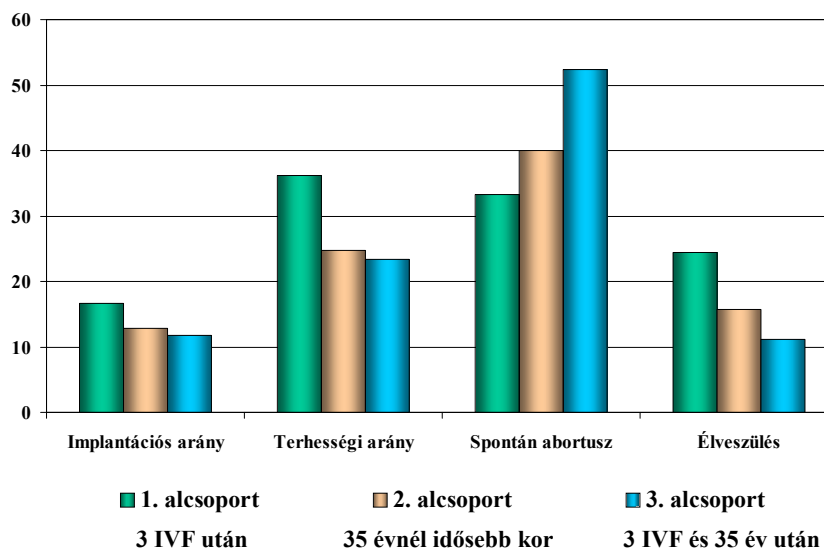
meg (PN2), ebből 66,2 % ICSI módszer segítségével. Az átlagosan visszahelyezett embriók száma 2,8. Az előzményben átlagosan 3,5 sikertelen IVF próbálkozás szerepelt. A beavatkozás során 177 terhesség alakult ki, ami 36,2 %-nak felel meg (177/263). 59 terhesség végződött abortusszal (33,3 % - 59/177). 24,1 % élveszülés történt (118/479). Az implantációs arány 16,7 % (226/1356). Az átlagos életkor 29,7 (22-34).

Az 2. alcsoportnál, ahol a LAH indikációja a 35 év feletti női kor volt, 248 IVF/ICSI – ET programot végeztünk, ez az össz. esetszám 30,0 %-a (248/827). Átlagosan 5,8 petesejtet aspiráltak, melynek 66,7 %-a termékenyült meg (PN2), ebből 63,2 % ICSI módszer segítségével. Az átlagosan visszahelyezett embriók száma 2,6. Az előzményben átlagosan 0,9 sikertelen IVF próbálkozás szerepelt. A beavatkozás során 65 terhesség volt igazolt, ami 24,8 % (65/248). 26 terhesség végződött abortusszal (40,0 % - 26/65). 15,7 % élveszülés történt (39/248). Az implantációs arány 12,8 % (85/665). A páciensek életkora 38,0 év (35-47).

Az 3. alcsoportnál, ahol a LAH indikációja 3 vagy annál több sikertelen IVF, és 35 év feletti női kor volt, 90 IVF/ICSI – ET programot végeztünk, ez az össz. esetszám 10,9 %-a (90/827). Átlagosan 6,5 petesejtet aspiráltak, melynek 65,4 %-a termékenyült meg (PN2), ebből 64,2 % ICSI módszer segítségével. Az átlagosan visszahelyezett embriók száma 2,8. Az előzményben átlagosan 4,3 sikertelen IVF próbálkozás szerepelt. A beavatkozás során 21 terhesség jött létre, ami 23,3 % (21/90). 11 terhesség végződött abortusszal (52,4 % - 11/21). 11,1 % élveszülés történt (10/90). Az implantációs arány 11,7 % (31/265). Az átlagos életkor 38,8 (35-46) (II. táblázat).

II. Táblázat. LAH eredmények megoszlása

	Terhesség	Spontán abortusz	Élveszülés
1. alcsoport több, mint 3 IVF ciklus 489 eset	177 (36,2 %)	59 (33,3 %)	118 (24,1 %)
2. alcsoport 35 évnél idősebb kor 248 eset	65 (24,8 %)	26 (40,0 %)	39 (15,7 %)
3. alcsoport 35 évnél idősebb kor és több, mint 3 IVF ciklus 90 eset	21 (23,3 %)	11 (52,4 %)	10 (11,1 %)
1-3. alcsoport 827 eset	263 (31,8 %)	96 (36,5 %)	167 (20,2 %)



1. ábra. LAH beavatkozást követően adatok az indikációk függvényében

3.β LAH és PZD eredményeinek összehasonlítása

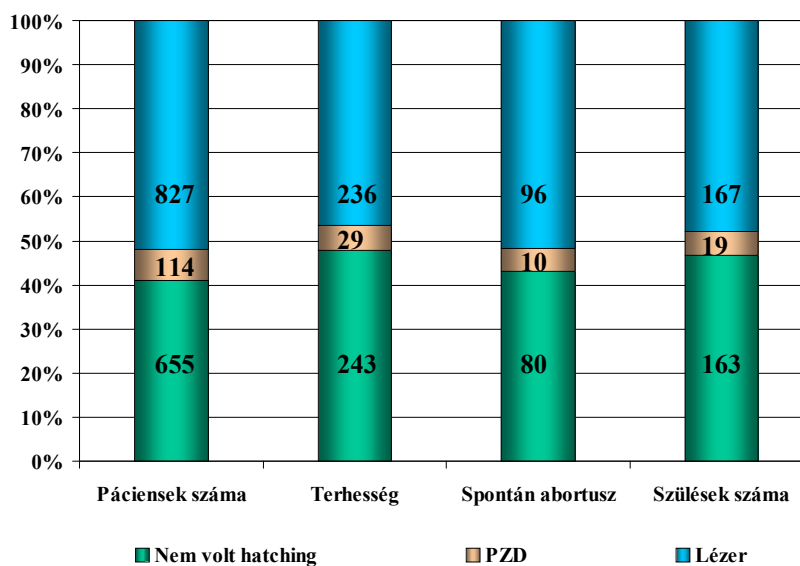
A 114 esetben végzett PZD eredményeként 29 terhesség jött létre, amely 25,4 % volt. Ebből 10 spontán abortusszal (34,5 %), 19 pedig szüléssel végződött. Tehát a „take home baby” arány 16,6 % (19/114). Az átlagos életkor a vizsgált csoportban 31,1 év. A beültetett embriók átlagos száma 3,1. A beültetett embriókra vonatkoztatott implantációs arány 11,6 % (2-3. ábra, III. táblázat).

Szemben a LAH csoporttal, ahol 263 terhesség jött létre, ami 31,8 %. Ebből 96 terhesség (36,5 %) spontán abortusszal végződött. A 167 szülés 20,2 % „take home baby” arálynak felel meg.

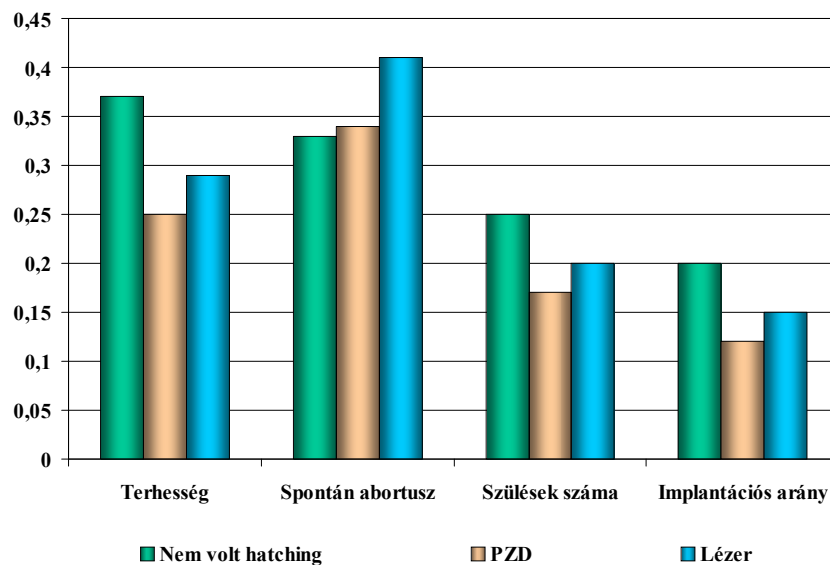
Az átlagos életkor a vizsgált csoportban 33,3 év. A beültetett embriók átlagos száma 2,8. A beültetett embriókra vonatkoztatott implantációs arány 15,2 % (1-3. ábra, III. táblázat).

III. Táblázat. A terhességi arányok összehasonlítása a különböző csoportokban

Hatching	Terhesség	Spontán abortusz	Implantációs arány	Szülések száma
Nem volt Esetszám: 655	243 / 37%/	80 /32,9/	19,9 %	163 /24,9%/
PZD Esetszám: 114	29 /25,4%/	10 /34,5%/	11,6%	19 /16,6%/
LAH Esetszám: 827	236 /31,8/	96 /36,5%/	15,2%	167 /20,2%/



2. ábra A terhességi arány összehasonlítása



3. ábra A terhességi arány grafikus összehasonlítása az eredményesség szempontjából

3.γ LAH után született első 134 gyermek nyomonkövetéses vizsgálata

Tanulmányunkban 134 gyermeket vizsgáltuk meg, akik 96 szülésből származnak. Nem végeztünk előzetes kromoszóma szűrést a pácienseknél az IVF program megkezdése előtt, de rákérdeztünk már ismert genetikai problémákra, pozitív családi háttérre, vagy a szülők által hordozott, ismert kromoszóma aberrációra.

76 esetben történt amniocentézis a prénatális kariotípus meghatározására, ami 79,1% az összes terhesség és 56,7% a megszületett gyermekek számára vetítve.

A 96 szülés 384 indított ciklus (25%) során jött létre. A 384 indított ciklusból 119 esetben regisztráltunk terhességet (30.9%). 23 terhesség végződött spontán abortusszal (19.3%).

117 esetben végeztük a LAH-t olyan esetben, ahol az életkor magasabb volt, mint 35 év (117/384, 30,5%). A terhességi arány ezen indikációjú csoportnál 21,4% (25/117) volt, a terhességi veszteség pedig 12% (3/25). 22 élvészülés zajlott le a 117 esetből (18,8%). Az implantációs arány 10,6 %. Az átlagos életkor 37,0 (35-44).

Mintánk 183 olyan pácienset tartalmazott, ahol minimum 3 sikertelen embrió transzfer történt az előzményben, ami a teljes beteganyag 47,7%-t (183/384) tette ki.

A terhességi sikerarány itt 42,6% (78/183), a spontán vetélési arány 21,8% (17/78) volt. 33,3%-ban jött létre élvészülés (61/183). Az implantációs arány 21,1%. Az átlagos életkor 32,1 év (25-35).

A 384 esetből 84 volt olyan akinél mind a két előbbi indikáció (35 év feletti kor, és háromnál több sikertelen embrió transzfer) megtalálható volt. A terhességi arány itt 19%-s (16/84), a terhességi veszteség pedig 18,7% (3/16). 13-szor történt élvészülés a 84 ciklusból (15,5%). Az implantációs arányt 9,2%-nak találtuk. Az átlagos életkor pedig 38,5 év (36-44) volt.

Az elvégzett ciklusokban az embrió transzfer arány 98,5 % (384/390). Prenatális kariotípus meghatározás 56,7%-ban (76/134 – 56,7%) történt az újszülöttek számára vonatkoztatva. Két struktúrális kromoszóma eltérést (2.6%) találtunk a 76 kariotípus meghatározásból, de mindkét esetben ez megtalálható volt legalább a szülők egyikénél (IV. táblázat).

IV. táblázat Kromoszóma transzlokációk LAH beavatkozást követően

Első eset	
Az anya kariotípusa	46, XX,inv.(9)
Az apa kariotípusa	45,XY,-13-14,+t, (13q14q)
Az újszülött kariotípusa	45,XY,-13-14,+t, (13q14q)pat.,inv(9)mat
Második eset	
Az anya kariotípusa	46,XX
Az apa kariotípusa	46,XY/47,+mar (3%)
Az újszülött kariotípusa	46,XX/47XX+mar (50%)

Mindkét esetben kiegyensúlyozott transzlokációt találtunk klinikai jelentőség nélkül.

2 major kongenitális malformáció (2,08%, 2/96) fordult elő anyagunkban, ami műtéti korrekciót igényelt az első időpontban végzett nyomonkövetés eredményeként.

Az első esetben speciális fejlődési rendellenesség volt (Fallot-tetralógia és ventricularis septum defectus). 7 nappal a műtét után a gyermek meghalt a perinatális periódusban.

A második esetben (ventrikuláris septum defektus volt), melyet műtéttel megoldottak, a gyermek jól fejlődik.

Az utánkövetés második periódusában még egy major malformáció derült ki (urether stenosis unilateralis cum hydronephrosis). A műtéti korrekció sikerrel járt, hathónapos korában a gyermek egészségesnek bizonyult.

Összesítve tehát a major malformációs arány 3,1 % (3 / 96).

A vizsgálati periódusban a Szent János Kórház Szülészeti Osztályán 863 szülésből 894 gyermek jött világra. 28 major malformációt (27/863 – 3,1%) regisztráltak, ami megegyezik a mi vizsgálati anyagunkban talált aránnyal.

Anyagunkban 5 minor malformációt regisztráltunk (5,2% - 5/96), amelyek a következők voltak: Unilateralis pes equinovalgus, pitvari septum deffektus (2 eset), cryptorchismus, kongenitális anyajegy. Kilenc egyéb minor malformáció derült ki a telefonon végzett kérdések alapján (Pyelum duplicatum, csípőficam, torticollis (2 eset), pitvari septum deffektus (2 eset), nyitott Botall-vezeték (3 eset).

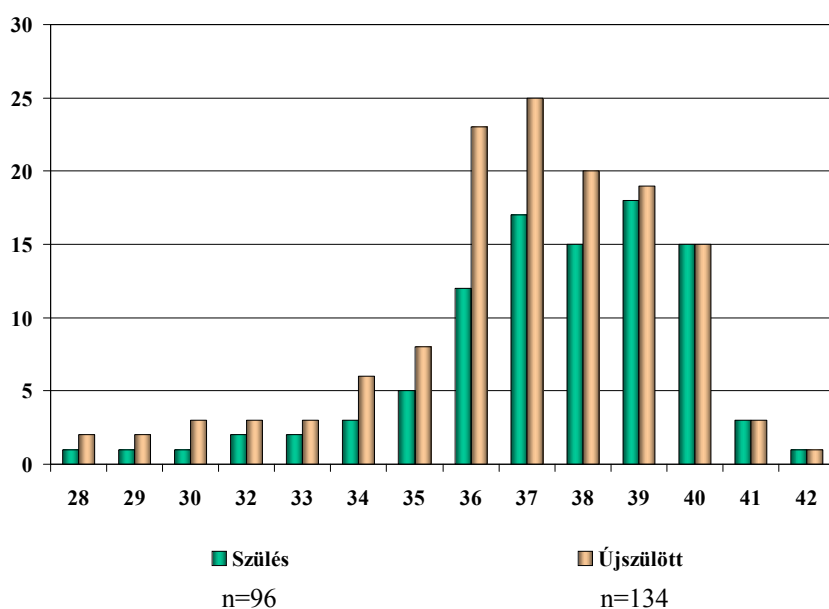
A 12. hetes telefoninterjú során (133/133, azaz 100 %) a hat hónaposnál (132/133 azaz 99,2 %) az 1 évesnél 131/133 azaz 98,5 %) tudtunk elérni a páciensek közül, az egy éves interjú során nem találtunk további anomaliát.

Utánkövetéses anyagunkban mindössze 1,5%-s volt a nem elérhető páciensek száma.

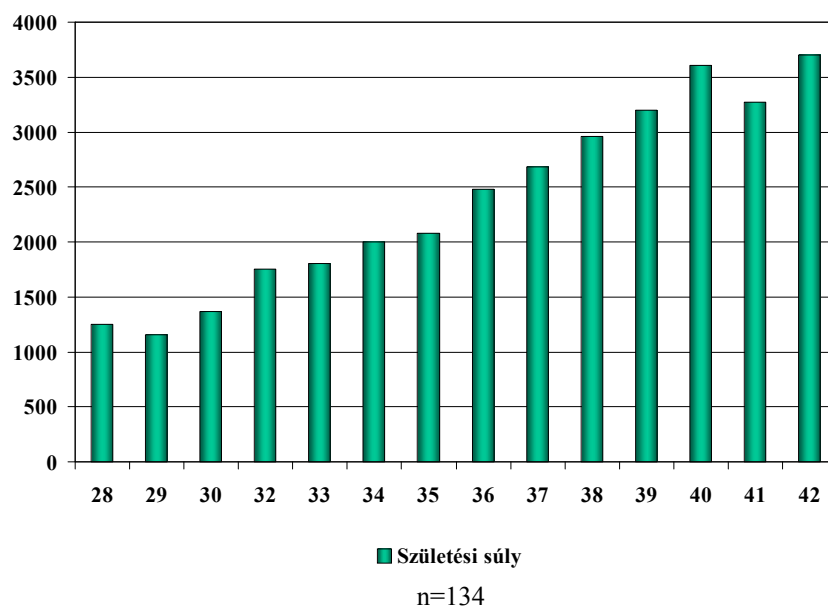
Vizsgálati anyagunkban 68 lány és 66 fiú született a 134 gyermekből (50,75 % vs. 49,25 %). A 96 szülésből 53 esetben (55,2%) végeztük a megtermékenyítést ICSI módszerrel.

61 egyes (63,5 %), 32 iker (33,3%) és 3 trigemini (3,12%) terhesség volt a 96 szülésből. Három esetben monozigótikus iker (3/35, 8,6 %) született.

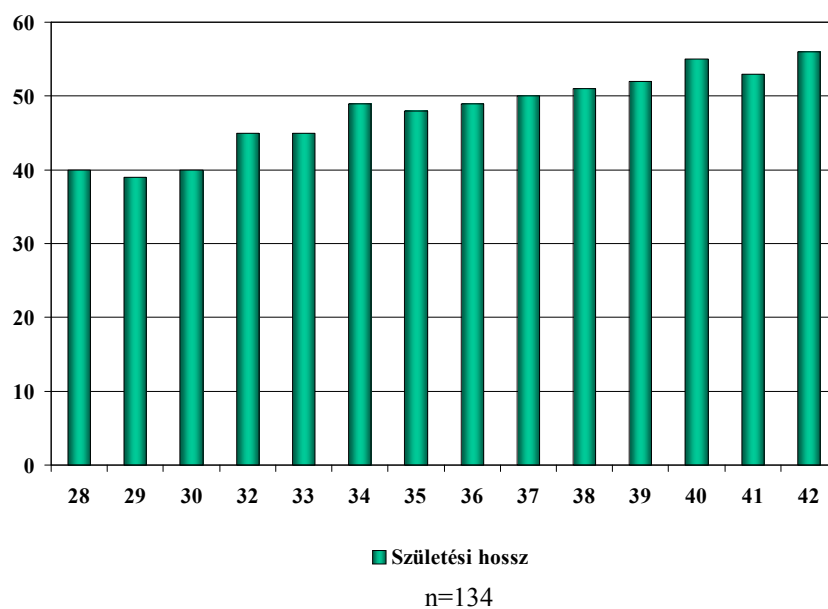
A limitált számú gyermek vizsgálata azt mutatja, hogy nem magasabb a kongenitális malformáció előfordulási aránya a LAH végzése után. A közeljövőben azonban szeretnénk nagyobb esetszám alapján is elvégezni a vizsgálatokat.



4. ábra A szülések megoszlása a gesztációs kor szerint LAH után



5. ábra. A születési súly megoszlása a gesztációs hetek függvényében LAH után



6. ábra. A születési hossz megoszlása a gesztációs hetek függvényében LAH után

A.4. MEGBESZÉLÉS

Jó pár tanulmány beszámol az AH eltérő módszereinek használati hatékonyságáról a páciensek különböző csoportjaiban. Főleg a rossz prognózisú, magasabb életkorú, a stimuláció során nagyobb mennyiségű FSH készítményt kapott, az előzményekben sikertelen implantációval járt programok utáni, illetve vastag ZP-vel rendelkező páciensek esetén. AH javasolt kokultúra és fagyasztás után felengedett embriók transzfere előtt is.

Az általunk vizsgált csoportban a megszületett 134 gyermekből 3 esetben (2.2%) fordult elő major malformáció LAH végzése után. Az in vitro kultúrában nevelt embriók tokjának megvasítása nem mutatott látható károsodást a lézer beavatkozás következtében. Ezért a hatching kétségtelenül alkalmas lehet az IVF-ET eredményének javítására. Az előző eredmények azt mutatják, hogy azon nők esetében, ahol rossz megvasadási eséllyel rendelkező embriók képződnek, segíthet a ZP megnyitása kevésbé a transzfer előtt végezve. Ugyanebben az időszakban született 894 hagyományos teherbeesést követően a major malformáció aránya (3,0%) volt kórházunkban. Ebből az következik, hogy sem a malformáció arányában, sem a kromoszóma aberráció tekintetében nem találtunk eltérést a két csoport között. Úgy gondoljuk, hogy a non-contact módszerrel alkalmazott dióda lézer használata nem veszélyes az utódok szempontjából. A módszer biztonságos, gazdaságos, kényelmes technika összehasonlítva az emberi asszisztált reprodukciós technikákban ismert AH módszerekkel.

A módszer biztonságát alátámasztják a megvasított tokú embriókból fejlődő egészséges utódok léte.

Több okból is javaslom a LAH alkalmazását. PZD esetén az embrió a beavatkozás kivitelezése miatt jóval hosszabb ideig van kitéve a nem optimális körülményeknek és a hatching eljárás potenciálisan növeli az embrió sérülésének lehetőségét.

Ugyanakkor a LAH végzése minimalizálja az időt, amit az embrió az inkubátoron kívül tölt el, hiszen a lézer operációs rendszer az embrió érintésének elkerülésével dolgozik, nem kell mikromanipulációs eszköz használata a beavatkozás kivitelezéséhez, ami önmagában hordozza az embrió sérülés lehetőségét. A keletkezett lyuk mérete elég nagy ahhoz, hogy a tokból történő kiszabadulás a megfelelő időben megtörténjen, de nem olyan nagy, hogy blasztomer veszteséghez vezessen az embrió transzfer során.

A DNS (fény elnyelése 300 nm) sérülése mindenképpen elkerülendő. Az 1480 nm hullámhosszon működő dióda lézer ezért ideálisnak mondható, hiszen hullámhossza jóval meghaladja a DNS elnyelési hullámhosszát, a víz nem abszorbeálja, viszont jól abszorbeálják a ZP glikoproteinjei.

Végezetül a módszer igen precíz ZP megnyitást tesz lehetővé, ami tökéletesen kontrollálható, reprodukálható.

Az IVF technikájának fejlődése ellenére, még mindig alacsony implantációs arány a jellemző, ami főként az életkorral és a többszöri sikertelen próbálkozással magyarázható.

III.B. fejezet A BLASZTOCISZTA KULTÚRA

B.1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az implantációs arány az asszisztált reprodukciós technikák eredményességének meghatározó faktora, ami alig változott az első lombik bébi, Louise Brown megszületése óta, az elmúlt huszonhárom év folyamán, mindannak ellenére, hogy azóta a módszert egyre szélesebb körben alkalmazzák és új gyógyszerek, táptalajok, technikai eljárások kerültek bevezetésre.

Az IVF programok során rutinszerűen a 2. vagy 3. napon történt az embriók méhüregbe való helyezése, hogy elkerüljék az osztódási blokk bekövetkeztét. Sok éven keresztül gyakorlatilag lehetetlen volt átjutni az osztódási blokkon a klasszikus táptalajok használatával. Ebben az időszakban az implantációs arány 10-20% volt.

Az utóbbi évtized hozta meg az öt – hat napos, blasztociszta stádiumig való továbbtenyésztésre a lehetőséget, az optimalizált táptalajok bevezetésével. Ennek azonban alapfeltétele volt az embrió fejlődés tápanyag igényének megismerése.

Számos laboratóriumban a világon jelentős változás történt az embrió tenyésztés feltételeiben is. Folyamatos a törekvés az embriók fejlődéséhez szükséges körülmények, berendezések optimalizálása, tökéletessé tétele érdekében.

Az egyik legfontosabb befolyásoló tényező az embrió és annak fizikai környezetének kölcsönhatásai. A másik fontos tény viszont az, hogy megfelelő minőségű embriót csak jó minőségű ivarsejtekből lehet létrehozni. Az ivarsejtek és embrió életben maradását, fejlődését a laboratórium működése mindenképpen befolyásolja.

Jól ismert tény, hogy az embriók 50%-ának in vitro fejlődése gátlódik a blasztociszta képződés előtt, az első hat nap során.

Ezt az ötven százalékos embrió veszteséget a kultúra szuboptimális körülményei okozzák részben, amelyben a környezet játszik igen fontos szerepet (Bavister, 1995).

A táptalaj összetétele a korai embrió fejlődés több eseményét befolyásolja. A táptalaj összetételétől is függhet a blasztociszta stádium elérése, a fejlődő embriók aránya, a blasztociszták sejtjeinek a száma, a sejt osztódás történései és a sejt halála. A tápoldat szuboptimális összetétele, illetve annak változása embrió veszteséghez, vagy igen nagy mértékű apoptózishoz vezetnek (Hardy és mtsa, 2001).

A tapasztalat szerint az embriók meglepő módon elég rugalmasan viselkednek, mivel változatos tenyésztési körülmények között képesek továbbfejlődni. A szuboptimális kultúrák azonban fejlődő, de mégsem életképes embriókat eredményezhetnek. Az életképesség legjobb definíciója az embrió jó megtapadási képessége, az egészséges gyermek megszületése. A klinikai terhesség bekövetkeztét a magzati szív működés megjelenésével mérjük, nem pedig a szérumbéta hCG szint emelkedésével, vagy a petezsák megjelenésével.

Az első humán blasztociszta képződését standard táptalajban való nevelés után Steptoe írta le (Steptoe, 1971) és ugyanezen táptalajban figyelték meg a „hatchingelődés” létrejöttét is (Edwards és Surani, 1978). Az implantációs arány jelentős növekedése azonban a kokultúra bevezetéséhez fűződött (Menezes, 1990, 1992, Bongso, 1994, Olivennes 1994), amit főleg majom vese epithelium egyrétegű sejttenyésztéséből állítottak elő (Vero sejtek). Habár a technika nem volt túlságosan időigényes, de magában hordozta a vírus, illetve baktérium fertőzés veszélyét. A Gardner által (Gardner, 1998/b) leírt szekvenciális táptalaj ezt a súlyos problémát feloldotta és alkalmazását széles körben elterjesztette.

Embrió fejlődés lépései

Az embrióban a 16 sejttes állapot elérése után megkezdődik a kompaktálódás, amely magába foglalja a blasztomérek közötti szorosabb kapcsolódást, mely az adhézió kialakulását eredményezi. Ekkor a blasztomérek határvonalait már nehezen tudjuk elkülöníteni. A negyedik napra a blasztomérek között kialakult csatorna átjárható a kis molekulák számára, mint a glükóz, az aminosavak és a nukleotidok. Az embrió erősen polarizálódik. Az ötödik napra kialakul a blasztocöl, a folyadékkal telt üreg. A blasztociszta két típusú sejtet tartalmaz. Az inner cell mass (ICM) biztosítja az embrió növekedését és bizonyos embrión kívüli membránokét. A trophoctoderm differenciálódott sejtjei a folyadék szállításért felelősek, így a blasztocöl feltöltődik folyadékkal, ami a blasztociszta kiterjedését okozza. A trophoctoderm külső embrionális szövet növekedését segíti elő csak.

Napjainkban jelentős kérdés az, hogy az embrió transzfert korai embrióval, vagy blasztocisztával végezzük-e?

Jó kiindulási pont lehet a női reprodukciós szervben lévő embrió környezetének vizsgálata, a petevezetőtől a méhig változó környezet tanulmányozása.

Az implantáció előtt lévő embrió igen dinamikus egység.

A megtermékenyült petesejt relatíve alacsony oxigénszintű környezetben található in vivo. Elsődleges energia szolgáltatója a piruvát. A korai embrió glükóz szükséglete minimális, de nem nulla. A fejlődési folyamat során az energia szükséglet nő a sejtszám többszöröződések, a fehérje szintéziskor, ami fokozott glükóz felhasználással jár.

Blasztociszta állapotban magasabb oxigén felhasználás állapítható meg, valamint a glükóz nagy mennyiségben történő felhasználása más energiaforrásokkal együtt.

A tápanyag elérhetősége a női reprodukív szervben tökéletesen tükrözi az embrió tápanyag szükségletének változását.

A petevezetőben lévő embrió környezetére jellemző a viszonylag magas piruvát (0,32 mM) és laktát (10,5 mM) koncentráció, valamint a viszonylag alacsony glükóz (0,05 mM) koncentráció. A méhüri folyadék összetételére ezzel ellentétben alacsony piruvát (0,1 mM) és laktát (5,87 mM) és magasabb glükóz koncentráció (3,15 mM) jellemző.

Ez a magyarázata annak, hogy a kiterjesztett, öt napos, blasztociszta kultúráknál változik a táptalaj összetétele az embrió növekedés szükségleteinek megfelelően. In vitro program végzése során kiterjesztett tenyésztéshez kokultúrát, vagy szekvenciális táptalajt (Gardner és mtsa, 1998/b) használunk (V. táblázat), ami a változó szükségleteket elégíti ki.

A korai embrió fejlődés optimális körülményei nem megfelelőek a jó minőségű blasztociszta kifejlődéséhez és differenciációjához. De fordítva is igaz, hogy azok a feltételek, melyek elősegítik a blasztociszta fejlődést és differenciációt károsak a korai embriók (két – három napos, négy – nyolc sejtes) számára. Az egyszerű táptalajok (pl. Earle's médium) képesek a szükségletek kielégítésére az első pár osztódás megtörténte, de nem képes megfelelően támogatni a későbbiekben az életképes blasztociszta fejlődést és differenciációt. Ezen hagyományos táptalajok használata esetén, még ha kiegészítik is piruváttal és szérummal a tápoldatot, a 40%-s blasztociszta fejlődés mellett, csak 7%-s implantációs arányt értek el (Bolton és mtsai, 1991). Huisman és mtsai (Huisman, 2000) komplex táptalaj előállításával (Earle's + Ham's F-10 tápoldat keverékéből) 26%-s blasztociszta implantációs potenciálról számolnak be. Habár ez az eredmény magasabb, mint az egyszerű táptalajok alkalmazása esetén, mégsem éri el a szekvenciális táptalajokkal elérhető 32,4%-s implantációs arányt (Marek és mtsai, 1999).

A blasztociszta fejlődéshez elengedhetetlenül szükséges szekvenciális táptalaj első tagjának (G1) egyedüli használatakor jó blasztociszta képződési és hatchingelődési arányt érhetünk el, azonban az ICM fejlődése és az embrió életképessége csökken. Ezzel magyarázható az a tény, hogy a G1 médium egyedüli használata esetén ugyan magas implantációs arányt észleltek a pácienseknél, de kevés volt az olyan petezsákok száma, amelyek magzati elemet tartalmaztak.

Ha 48 órával a megtermékenyülés után G2 táptalajba helyezték át az embriókat a blasztociszta fejlődés és hatching azonos mennyiségű volt, de szignifikánsan több ICM sejt alakult ki, amely jó magzati fejlődést eredményezett (Gardner és mtsa, 1998/b), ezáltal csökkent azon petezsákok száma, amelyekből hiányzott a magzati elem.

V. Táblázat A Gardner-féle alap és szekvenciális táptalajok összetétele

IVF-100	G1,2	G2,2
CaCl ₂	+	+
EDTA	+	-
Glükóz	+	+
Humán Szérum Albumin	+	+
MgSO ₄	+	+
Penicillin G	+	+
KCl	+	+
KH ₂ PO ₄	-	-
Na-bikarbonát	+	+
NaCl	+	+
Na-laktát	+	+
Na-piruvát	+	+
	Alanin	+
	Alanil-glutamin	+
	Aszparagin	+
	Aszpartát sav	+
	Glutamát	+
	Glicin	+

	Prolin	+
	Szerin	+
	NaH ₂ PO ₄	+
	Taurin	-
		Arginin
		Ca-pantotenát
		Cholin-klorid
		Cisztin
		Folsav
		Hisztidin
		L-inozitol
		Izoleucin
		Leucin
		Lizin
		Methionin
		Nikotin-amid
		Fenilalanin
		Piridoxin
		Riboflavin
		Tiamin
		Treonin
		Triptofán
		Tirozin
		Valin
pH: 7,35	pH: 7,35	pH: 7,35
Ozmolaritás: 283mOsm/kg	Ozmolaritás: 263mOsm/kg	Ozmolaritás: 263mOsm/kg

Négy speciális táptalaj alkotórésszel kell kiemelten foglalkoznunk

- a. glükóz
- b. aminosavak
- c. EDTA-ethyléndiaminéterecet sav
- d. makromolekulák

a./ Glükóz

Több tanulmány alátámasztja, hogy a magas glükóz szint és foszfát tartalom, aminosav hiánnyal kombinálva az embrió retardációjához, a fejlődés, az osztódás leállításához vezet. A glükóz toxicitása azonban csak a foszfát jelenlétében nyilvánul meg. Ezt a hatást azonban csökkenti az aminosavak, az EDTA és a vitaminok jelenléte. A glükóz toxikus hatása jól kifejeződik az olyan médiumokban, mint a HTF. A glükóz kivonása a blasztociszta táptalajból azonban csökkentette a magzati elem megjelenésének gyakoriságát, ami bizonyította jelentős szerepét az életképes embrió fejlődésében. A glükóznak nemcsak mint energiaforrásnak van jelentősége, hanem alapvető a membrán lipid bioszintézisében, valamint a nukleinsavak és triglicerol bioszintézisben is.

Az implantációkor a blasztociszta környezete oxigénszegény.

A petesejt és a korai zigóta számára nem előnyös a magas glükóz szint. A petesejt körül lévő cumulus sejtek metabolizálják piruváttá és laktáttá. 8 sejtes kortól viszont szükséges a glükóz.

Vagyis a fejlődés korai szakaszában 0-3 napos korban az embrió glükóz szükséglete viszonylag alacsony, később 4-6 napos korban, morula, blasztociszta állapotban a magas glükóz szükséglet jellemző és alapvető követelmény a továbbtenyészhetőség szempontjából.

b./ Aminosavak

A petevezető és a méhüri folyadék állandó mennyiséget tartalmaz szabad aminosavakból (Menezo, 1972). A petesejtek és az embriók sajátos rendszerrel szállítják az aminosavakat (Van Winkle, 1988). Az aminosavaknak fiziológiás szerepe van a pre- és peri-implantációs időszakban az emlős embriók fejlődésekor.

A petevezetőre és a méhüri folyadékra az aminosavak közül az alanin, aszpartát, glutamát, glicin, szerin és taurin magas koncentrációja jellemző (Menezo, 1972, Casslen, 1987). Az ICSI végzéséhez a lebontott petesejteket aminosav tartalmú táptalajban tárolják, mert ez csökkenti vagy megelőzi az intracelluláris stresszt. 8 sejtes állapotig a nem esszenciális aminosavak és az esszenciálisak közül a glutamin növeli az osztódási rátát (Steeves és mtsai 1999, Lane és mtsai 1997). Az előbb említett aminosavak elősegítik a blasztocöl formáció kialakulását és a hatchinget. Az esszenciális aminosavak stimulálják az osztódási arányt és elősegítik a blasztociszta inner cell mass-ának fejlődését (Lane és mtsai 1994). A legfontosabb, hogy az aminosavak növelik az embriók életképességét (Gardner és mtsai 1993, 1994). Az aminosavak fontos irányítói néhány celluláris funkciónak, mint kelát képződés, ozmolaritás fenntartás, pH pufferelés, antioxidáns hatás, energia metabolismus szabályozás, ugyanakkor bioszintetikus prekursorok és energia szubsztrátok (Gardner és mtsai 1997, 1999/b).

c./ Kelátképző komplex: EDTA

Már 20 évvel ezelőtt beszámoltak Abramczuk és mtsai (Abramczuk, 1977) a kétértékű kation, az EDTA előnyös hatásáról az embrió tenyésztő oldatokban. Mehta és Kiessling (Mehta, 1990) bizonyította egér embriókkal végzett kísérletei során, hogy az EDTA 10 μ M és 150 μ M koncentrációban való alkalmazása átsegíti az embriókat a 2 sejtes osztódási blokkon, egészen a blasztociszta stádiumig. Alkalmazása ezért széles körben elterjedt (pl. CZB, KSOM, G1, x-basal HTF, DM2 és SOF táptalajokban).

A korai embrió kultúrákban az EDTA előnye korlátozott (Gardner és mtsai 1996, 2000/a). Az EDTA az osztódó egér embrióknál megelőzi a glikolízis abnormális aktiválódását, úgy, hogy gátolja, a 3-foszfoglicerát kinázon keresztül a kinázok citoszolját.

A korai embrió ICM-je elsődleges energiaforrásként a glikolízist használja, az EDTA a kompakt állapotban lévő embrió ICM fejlődését gátolja (Gardner és mtsai 1996, 2000/b). Ezért a kompakt embrió stádium után alkalmazott táptalajokból kihagyták az EDTA-t (pl. G2, DM3, és Ham's F-10) melyek a blasztocisza stádium elérésére használnak.

d./ Makromolekulák

Általánosan alkalmazott az in vitro tenyésztések során az anyai szérum (5-20%-os koncentrációban), ami fehérje forrásként szerepel. Néhányan magzati köldökzsínór szérumot részesítenek előnyben. Ennek azonban árnyoldalai is vannak, mint pl. az infekció veszélye (mind az embrió, mind a személyzet számára), tekintélyes költség, időigényes a begyűjtése és előkészítése (szűrés magzati minta esetén). Továbbá több, a szérumban lévő komponens alig definiált. A szérumban lévő makromolekulák (hormonok, vitaminok, zsírsavak) fehérjékhez kötve találhatók (Barnes és mtsai, 1980).

A makromolekulák koncentrációja (ugyanúgy, mint a szérum egyéb összetevőie), függ a páciensről, a menstruációs ciklus adott szakaszától, ezért lehetetlen pontosan meghatározni az alkotórészek koncentrációját. Számtalan érv szól tehát amellett, hogy mellőzzük a szérum használatát. Arról nem is beszélve, hogy in vivo az emlősökben soha sincs kapcsolatban az embrió a szérummal, nincs szérum átszivárgás a női reproduktív traktus folyadékába (Leese, 1988). A szérum itt leginkább patológiásnak tekinthető.

Nyilvánvaló tény, hogy a szérum káros az implantáció előtt álló embrió növekedésére. Szérummentes táptalajok használatával bizonyították, hogy a szérum indukálhat idő előtti blasztulációt (Walker és mtsai, 1992, Thompson és mtsai, 1995), változást az embrió morfológiájában (Gardner és mtsai, 1994, Thompson és mtsai,

1995), zavart az ultrastruktúrában (Thompson és mtsai, 1995, Dorland és mtsai, 1994) és az energia átalakításban (Gardner és mtsai, 1994). Háziállatoknál a szérummal kiegészített táptalajok használatának következtében több esetben történt magzati veszteség és abnormálisan megemelkedett a magzati súly (Thompson és mtsai, 1995). Menezo és mtsai, (Menezo, 1999) azonban kokultúrát használva 15%-s szérum kiegészítéssel nem számoltak be különbségről a születési hosszban, és születési súlyban. Végző soron úgy tűnik, hogy a táptalaj szérummal való kiegészítését lehetőleg kerüljük el.

A szérum albumin relatíve tiszta frakció, némi zsírsavval és más kis molekulákkal szennyezve.

Az utóbbi magába foglalja, mint embriótrofikus faktort a citrátot, ami stimulálja az osztódást és a növekedést patkány morulában és blasztocisztában (Gray és mtsai, 1992). A szérum albumin eredetében ugyan nincs szignifikáns különbség (Batt és mtsai, 1991, McKiernan és mtsai, 1992) mégis megfigyelhető a „batch to batch” variáció (Batt és mtsai, 1991, Kane, 1983), így bármilyen albumin preparátum használatakor alapvetően fontos az ellenőrzése minden egységnek, hogy nem akadályozza-e embrió fejlődését egér embrió kultúrában, mielőtt klinikai felhasználatra kerül. Napjaink újdonsága a recombináns géntechnológiával előállított albumin, amely ezen gondok nagy részét megoldja és segítségével standardizálni lehet a táptalajokat (Gardner és mtsai, 2000/b).

A CO₂ és a háromgáz rendszer (CO₂, O₂, N₂)

A petesejtek, zigóták és embriók szövettenyésztésében az egyik fontos tényező a CO₂ termosztát megfelelő minősége, ahol az embriók körüli atmoszférikus zavar minimális. Ezen turbulenciát egyébként a pH és a hőmérséklet változása hoz létre. Az embriók fejlődéséhez az a legideálisabb körülmény, ha ilyen zavar nem keletkezik a tenyésztés ideje alatt és a gázok koncentrációja is kiegyenlített. Ezt igen nehéz biztosítani, főleg olyan szövettenyésztő laboratóriumban, ahol nagy esetszámmal dolgoznak. Ennek elérésében segíthet az olyan típusú termosztát használata, mely kaptárokra osztott és egy egységben csak egy pár anyaga van elhelyezve.

Ezért lehetőleg több inkubátorra van szükség, ami főleg igaz a kiterjesztett kultúrák használata esetén. A felső kamrákat a táptalajok equilibrálására használjuk, míg az aljához közelebbieket a szövetenyésztésre úgy, hogy minimalizáljuk az inkubátorban lévő embriók számát.

A Gardner féle táptalaj használatakor emelt, 6 % CO₂ koncentráció javasolt, valamint a háromgáz szisztéma bevezetése, ami 5%-s, alacsony O₂ koncentrációt és 89%-s nitrogén koncentrációt jelent.

A pH jelentősége

Az optimális pH a táptalaj környezetében 7,4, az embrió belsejében 7,2. (Phillips, 2000, Lane 1998, Edwards, 1998). A táptalajok speciális komponensei, mint például a laktát és az aminosavak befolyásolják ezt a hatást és a puffer együttesen. A laktát két izomerje ismert (D és L), de csak az L (balra forgató) aktív biológiailag. A laktát D és L izomerje együttesen csökkenti az embrió pH-ját (Edwards, 1998), ezért a táptalajok csak az L izomert tartalmazzák. Míg a laktát magas koncentrációja a pH-t csökkenti (Edwards, 1998), addig az aminosavak növelik az intracelluláris puffer kapacitást és segít a pH-t 7,2 körül tartani. A CO₂/bikarbonát által pufferált táptalaj pH-ját nehéz beállítani. A pH mérését elektróddal, vagy fenol-vörös segítségével lehet ellenőrizni.

A pH megfelelő értékéhez 6-7%-os CO₂ koncentráció a legideálisabb. Annak is jelentős szerepe van, hogy mennyi időt tölt el az embrió a termosztáton kívül, hiszen az idő elteltével folyamatosan nő a pH. Olajjal borított kultúra használata némiképp csökkenti a CO₂ kiáramlási sebességét.

Az oxigén

Az női nemi traktusra jellemző az alacsony O_2 koncentráció, amit azon tanulmányok is alátámasztanak, melyek redukált O_2 koncentráció (5-7%) mellett történt a szövetyenyésztés. Itt magasabb préembrió kialakulási arányt írtak le (Quinn, 1978, Gardner 1999/b).

Gardner és munkatársa (Gardner, 2001) szerint az alacsony oxigén koncentrációban (5%) nevelt blasztociszták szignifikánsan több sejttel rendelkeznek, mint a magas O_2 koncentrációban (20%) fejlődötteké.

A hőmérséklet

A hőmérséklet változása az embrió korai fejlődése során csökkenti a fejlődési potenciált. Ha egér zigótákat öt percig szobahőmérsékleten tartunk, gátlódik az osztódási arány és csökken a fejlődés. Növelve ezt az időt tíz – tizenöt percre, tovább csökken 50%-al a blasztociszta stádiumot elérő embriók aránya a kontrollhoz viszonyítva (FitzGerald-Scott és mtsai, 1993). Az emberi petesejt szobahőmérsékleten tartása irreverzibilis károsodást okoz a meiótikus orsóban (Pickering és mtsai, 1990). Ezért fontos állandó 37 fokos hőmérsékletet biztosítani a petesejtek és embriók kezelésekor.

A fény

A látható fény hatását emlős embriókra több tanulmány vizsgálta. Hörcsög petesejteket egy órán át látható fényben tartva teljesen lehetetlenné tette a teljes meiósis létrejöttét és a fertilizációt (Hirao és mtsai, 1978). Kevés fényt és alacsony O_2 koncentrációt használva szignifikánsan növekedett a blasztociszta formáció kialakulása (Noda és mtsai, 1994).

A táptalaj mennyiség arányai és tárolása

Az embrió csoportban és cseppben történő nevelése olaj alatt a leggyümölcsözőbb eljárás. Természetes körülmények között a női ivarszervben mikroliternyi mennyiségű folyadékban fejlődik az embrió. In vitro ez a mennyiség elérheti akár az 1 ml-t is. Így azonban az embrió által termelt autokrin faktor(ok) felhígulnak, ezáltal elvesztik hatékonyságukat (Lane, 1992), a fejlődést elősegítő képességüket.

Csoportban (maximum 10) és 20 μ l-s térfogatban végezve a nevelést szignifikánsan emelkedik az embriók életképessége és az ICM fejlődése (Gardner, 2001).

Az olajjal történő lefedés meggátolja a táptalaj elpárolgását, így csökkenti a táptalaj ozmolaritásának növekedését, csökkenti a pH változását, amit a táptalajból történő szén-dioxid kiáramlás okoz, az inkubátoron kívül töltött idő függvényében, az embriók morfológiai vizsgálata alatt. Legkedvezőbb a könnyű paraffin vagy ásványi olaj. Az olaj kiválasztásával és tárolásával gondosan kell eljárni, hogy elkerüljük a toxikus hatást. Sötétben kell tárolni, nem lehet hosszú ideig a termosztátban tárolni az egyensúlyi idő elteltével. Sztírol alapú szövettenyésztő edénybe nem mérhetjük ki, mivel az olaj kimossa, kilúgozza a sztírolt az edényből. Az egér embrió teszt elengedhetetlen feltétele a klinikai használatnak, különös tekintettel a nekrozis jelének megfigyelése, ami jelentős a blasztociszta fejlődés kérdésében.

Mivel az elérhető táptalajok néhány nem stabil komponenst is tartalmaznak, ezért kezelésük milyensége igen fontos. A két legfontosabb nem stabil komponens az aminosavak és vitaminok. Az aminosavak viszonylag stabilak 4°C fokon, de 37°C fokon spontán töredeznek és ammónium szabadul fel belőlük. A glutamin a legkevésbé stabil aminosav, a két aminosav csoportja miatt, ezért nagyobb mennyiségű ammóniumot termel, mint bármelyik más aminosav. Az ammónium szignifikánsan rontja az embrió fejlődését in vitro (Gardner, 1993) és a rákövetkező fejlődést a méhben transzfer után (Lane, 1994). Ezért fontos, hogy a táptalaj csak a minimálisan szükséges egyensúlyi időt töltse csak az inkubátorban a felhasználás előtt.

A vitaminok fényérzékenyek, ezért a táptalaj fényen eltöltött idejét minimalizálni kell, lehetőleg sötét üvegben vagy alufóliába csomagolva tároljuk.

A BLASZTOCISZTA TRANSZFER ELŐNYEI ÉS HÁTRÁNYAI

Az előnyök

1. Blasztociszta transzfer esetén nagyfokú szinkronizáció tapasztalható az embrió fejlettségi foka és az endometrium érettsége között. Alapvetően fontos az a tény, hogy a tápanyag ellátottsági szint különböző a petevezetőben és a méhben (pl. a glükóz koncentrációban lévő eltérés). Az állatkísérletekből ismert tény, hogy a petefészek gyógyszeres kezelése, a hiperstimulációja alatt a női traktus kevésbé optimális környezet az embrió fejlődésére, mint a spontán ciklus alatt. A gyógyszeresen kezelt ciklusokban csökkentebb az embrió és magzat növekedése. Ezért jónak tűnik redukálni azt az időt, amíg ennek a nem ideális in vivo környezet hatásainak van kitéve az embrió - a kiterjesztett kultúra segítségével.

2. A 2-8 sejtes állapotban lévő embrionális genom transzkripciója még csak a kezdetén van (Braude és mtsai 1988, Taylor és mtsai 1997), ezért nehéz eldönteni, hogy melyik embrió rendelkezik jobb fejlődési képességgel. A blasztociszta stádiumig való tenyésztés során eldönthető, hogy melyek azok az embriók, amelyeknél csökkent a fejlődési képesség vagy fellép az osztódási blokk.

Természetesen a korai embrionális paraméterek értékelésének és ezek alapján történő szelekciónak is vannak hívei. Scott és munkatársai (Scott, 1998), valamint Edwards és munkatársai (Edwards, 1999) leírása alapján próbálkozások történtek a pronucleus állapotban lévő zigóta minőségi megítélésre és ezáltal a későbbiekben az embrió szelekcióra.

Ezen módszer alkalmazásával végzett korai embrió szelekció az említett szerzők anyagában, az implantációs arány emelkedéséhez vezetett.

Gerris és munkatársai (Gerris, 1999) a harmadik napos embriók minősítési rendszerét írták le, amely alkalmazásával végzett szelekció szintén az implantációs arány emelkedésével járt.

Az is jól ismert tény, hogy az embriók minőségét alapvetően meghatározza az ivarsejtek minősége, de ennek megítélésére még nem sikerült a limitált információk következtében használható minősítési rendszert kidolgozni.

3. Nem minden megtermékenyült petesejt tökéletes. A legtöbb eltérés kromoszómális okra vezethető vissza. Körülbelül a fertilizált petesejtek 25%-a aneuploid (Kola és mtsai 1993, Van Blerkom 1994), ami az anyai korról szoros összefüggésben van (Janny és mtsai 1996). Az anyai kor emelkedésével nő a kromoszóma rendellenességek aránya az embrió kariotípusában (Munne és mtsai 1995). 20 és 34 év között 16%, 40 év fölött 53%-ban fordul elő.

Az öt napos fejlődés folyamán az ilyen embriók nagyobb részénél a fejlődés leáll, vagyis szelektálódnak, így nem kerülnek transzferre.

Emellett a gén termelés hiánya, vagy az embrionális genom aktiválódásának hiánya is előfordul.

A kromoszóma rendellenességeket és mozaicizmust egyaránt leírták a leállt fejlődésű és rossz morfológiájú embrióknál is (Munné, 1994, Coonen és mtsai, 1994, Munné és Cohen, 1998) ugyanúgy, mint normálisan fejlődő embriók esetén (Harper, 1995, Munné és Cohen, 1998) korai fejlődési stádiumban. A mozaicizmus előfordulási aránya abnormális és normális embriók esetén 29-50% között változik (Delhanty, 1997). Veiga (Veiga, 2001) vizsgálati anyagában alacsonyabb mozaicizmus arányt talált a blasztociszta formációban, mint a korai embriók esetén.

Az embrió minősége, fejlődési dinamikája és az anyai kor arányban áll a kromoszóma rendellenességek előfordulási gyakoriságával (Munné, 1995).

A mozaicizmus gyakorisága kapcsolatban van, mind a tenyésztési körülményekkel, mind a hormonális stimulációval (Munné, 1997).

Nem találtak összefüggést azonban a kromoszóma rendellenességek vonatkozásában a hagyományosan végzett IVF vagy az ICSI végzése során (Munné, 1998).

Ezen tényezők egyike, vagy együttese okozza sok embrió fejlődésének leállását in vitro. Csak azok embriók, melyek elérik a blasztociszta stádiumot hordozzák a fejlődési potenciál lehetőségét. A genetikailag sérült embriók kisebb valószínűséggel élik túl a hosszabb tenyésztési periódust (Evsikov és Verlinsky, 1998). A blasztocisztákban átlagosan 72% diploid sejtet talált Coonen (Coonen, 2000). Sandalianas (Sandalinas, 2000) végső konzekvenciaként azt állapította meg, hogy azon embriók melyek haploidok, vagy autoszómális monoszómiát hordoznak (kivéve a 21-s monoszómiát) kisselektálódnak az in vitro tenyésztés során, de a triszómia nem.

4. A méhgörcsök negatív összefüggést mutatnak az embrió transzfer sikerének kimenetelével, mivel az összehúzódás kilökheti az embriókat a méh üregéből.

A méh összehúzódásának gyakorisága és erőssége függ a tüssző punkció időpontjától eltelt napok számától. A petesejt nyelés napján figyelték meg a legintenzívebb kontrakciós tevékenységet (Lesney és mtsai 1998). Két, három nappal a petesejtnyelés után kevésbé gyakoriak a kontrakciók, az ötödik napra pedig már jelentősen csökken a görcskészség, addigra alig észlelhető. Ezért előnyös az ötödik napos, késleltetett, blasztociszta transzfer, hisz ilyenkorra csökken a méh kontrakció készsége, így kisebb az esély az embrió kilökődésére, elvesztésére.

5. A petesejtnyeréstől eltelt napok számának növekedésével csökkenthető a transzferált embrió száma, így nagyobb valószínűséggel elkerülhető a többes terhesség, amely a terhesség kimenetelét nagymértékben befolyásolja.

6. Hosszabb az időtartam a blasztociszta transzferig, így elegendő idő áll rendelkezésünkre a blasztomer biopszia, preimplantációs genetikai vizsgálat elvégzésére.

7. A blasztoซิสhta tenyésztés öt napos időszak alatt, diagnosztikus információ nyerhető azon pácienseknél, akiknél többszöri sikertelen IVF program történt két vagy három napos embrió transzferrel. Kiderülhet, hogy az embriók képesek-e elérni egyáltalán a blasztoซิสhta stádiumot, illetve milyen fejlettségi stádiumig képesek eljutni.

8. Csökkenti a korhoz kapcsolódó spontán abortusz arányt, mert az öt napos tenyésztés során nagyrészt kisselektálódnak a kóros genetikai állománnyal rendelkező embriók

A blasztoซิสhta transzfer hátrányai

1. Az előre eldöntött blasztoซิสhta transzfer esetén fent áll a potenciális lehetőség arra, hogy nem fejlődik blasztoซิสhta és így egyáltalán nem történhet embrió transzfer. Átlagosan a harmadik napon a ciklusok 2,9%-ban, míg az ötödik napon 6,7%-ban nincs megfelelő fejlettségű embrió és ezért nem történik ET (Marek,1999). Bár ötödik napra nő azon esetek száma, ahol nem lehet ET-t végezni, mégis nő a terhességi sikerarány és az implantációs arány a petesejtnyerésre vonatkoztatva (Mátyás és mtsai. 2000). Azért, hogy minél nagyobb eséllyel elkerülhessük, hogy a pácienseknél ne történjen ET, alaposan meg kell válogatnunk azon eseteket, akik a kiterjesztett kultúra használatára alkalmasak.

2. A tenyésztés folyamán elkerülhetetlen néhány jó minőségű korai embrió elvesztése. Ez a veszteség a tenyésztési manipulációkkal, a kultúra változó körülményeivel és az emberi tényezőkkel magyarázható.

3. Kevesebb embrió marad fagyasztva tárolásra, mivel az embriók több, mint fele kisselektálódik, azaz leáll az öt napos tenyésztés során a fejlődésben.

4. Növekszik monozigotikus ikrek előfordulásának aránya.

5. A tökéletlen embrió tenyésztési körülmények jobban érvényre jutnak a hosszabb tenyésztési periódus alatt. A széndioxid termosztátok ajtajának gyakoribb nyitogatása és az embriók, kötelező mikroszkópos ellenőrzése, valamint friss táptalajba helyezése pH és hőmérséklet változással jár. Ha ehhez még lassú és a gyakorlatlanságból fakadó, nem elég precíz embriológusi munka is hozzáadódik, az végzetes lehet a fejlődő embriók számára. Kezdő intézetek sikertelen blasztociszta tenyésztése mögött gyakran ezek a tényezők húzódnak meg.

Az ICSI és a blasztociszta fejlődés összefüggései

Meg kell említeni, hogy a rossz minőségű sperma kép összefüggésben lehet annak biokémiai abnormalitásával, ami negatív hatással van a kromatin állományra és/vagy a DNS-re. Ha a spermaszám 10 millió/ml alatt van, ez rosszabb minőségű embriók létrejöttét eredményezheti nagyobb valószínűséggel, valamint alacsonyabb blasztociszta fejlődési és terhességi arányt. Shoukir és mtsai (Shoukir, 1998) vizsgálataik során azt találták a blasztociszta fejlődési arány alacsonyabb ICSI esetén (26,8 %), mint IVF után (47,3 %). Az alacsonyabb fejlődési arány több paraméterrel lehet összefüggésben, mint például a sperma minősége, ICSI során történő technikai problémák. Ezt Gardner (Gardner, 1998/b) vizsgálatai során nem erősítette meg.

B.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A Szent János Kórház Budai Meddőségi Centrumában 1999. február óta Magyarországon elsőként alkalmaztunk szekvenciális táptalajt az embriók 5-6 napig történő tenyésztéséhez, blasztociszta stádiumig.

Páciens szelekció blasztociszta tenyésztésre

- a ciklus harmadik napján mért bazális FSH értéke 15 IU/L alatt legyen
- a női kor nem lehet több, mint 45 év
- a méh ürege szabályos kell, hogy legyen
- megfelelő minőségű sperma paraméter IVF-re, vagy ICSI-re
- ne legyen kontraindikációja a terhességnek
- minimum 10 db 12 mm-nél nagyobb tüsző a hCG adás napján

- a stimulációra jól válaszoló páciens un. „normal responder”
- fiatal női életkor
- megfelelő számú zigóta, (min. 4 db.)
- a harmadik napon megfelelő fejlettségű és minőségű embriók

A páciensek átlagéletkora 31,4 év volt (22-42).

A petesejtek megtermékenyítése az esetek 35 %-ban hagyományos IVF-el, 65 %-ban ICSI módszerrel végeztük.

A petesejt leszívása a hCG injekciót követően 35 órával történt, transzvaginális ultrahangvezérelt follikulus punkcióval.

Szövettenyésztés

A petesejteket a felkeresés után Nunclon (négylyukú) steril, nem toxikus, nem pirogén szövettenyésztő edénybe, 1 ml IVF médiumba (Vitrolife, Svédország) helyeztük, melyet egy éjszakán át egyensúlyoztunk 37°C-on, 6% CO₂ koncentrációban.

A petesejtek megtermékenyítése vagy petesejtenként 100000 jól mozgó spermiummal (tradicionális IVF), vagy ICSI módszerrel történt.

A petesejtek megtermékenyülését 15-18 órával az inszemináció után ellenőriztük le, invert mikroszkóp segítségével (Nikon).

A petesejt nyeréstől a megtermékenyülés elbírálásáig a szövettenyésztés IVF (IVF Science) táptalajban történt, 50 µl-s cseppekben, csoport kultúrában (maximum négy zigóta/csepp), 500 µl olajjal (Ovoil, Vitrolife) lefedve, 37°C 6% CO₂ tartalmazó termosztátban, 6001-s Petri csészében (Falcon).

A két pronukleusszal rendelkező zigótákat tenyésztettük csak tovább G 1.2 (Gardner féle) táptalaj (Vitrolife) 50 µl-s cseppjében, csoport kultúrában, 500 µl olajjal fedve, 6001-s Petri csészében (Falcon). Az áthelyezésnél két mosócseppet használtunk, mielőtt a zigótákat a kultúrcseppbe helyeztük.

Az embriók osztódását és morfológiáját a második napon nem vizsgáltuk.

Az embrió fejlődés vizsgálatának következő időpontja a petesejt vételt követő harmadik nap reggele volt (tehát a hagyományos metódusokban alkalmazott 24 órás ellenőrzések helyett itt elegendő a 48 órás is). Ekkor a megfelelő fejlettségű és minőségű embriók (legalább 6-8 sejtes stádium) tenyésztését G 2.2 (Vitrolife) táptalajban folytattuk, 50µl-s cseppekben, két mosócseppel, csoport kultúrában, olaj felülréteggel. A G 2.2 táptalajt minimum 6 órán át egyensúlyoztuk 37 °C-on, 6 % CO₂ koncentrációban.

A petesejtvételt követő ötödik napon a blasztocisztákat a Gardner féle rendszer szerint (Gardner és mtsa, 1999/a) értékeltük, invert mikroszkóppal és 2-3 blasztocisztát embrió transzferre kiválasztottunk.

A blasztociszták szelekciójának alapja az ICM megléte és elkülönültsége volt, valamint, hogy sok, kicsi, folyamatos elhelyezkedésű trophoctoderm sejt legyen.

Amennyiben kiterjedt blasztociszta fejlődött, ezt elsőbbséggel választottuk be a transzferálható blasztociszták közé.

A kiterjedés mértéke és hatchingelődés státusza alapján 1- 6-ig terjedő skálát használtunk, az ICM (12-13. kép) és a trophoctoderma értékelésére két betűt alkalmaztunk.

A kiterjedés mértéke és hatching állapot:

1. Korai blasztociszta: a blasztocöl térfogata kevesebb, mint a fele az embriónak (8-9. kép).
2. Blasztociszta: a blasztocöl térfogata több mint fele az embrióéknak (10-11. kép).
3. Teljes blasztociszta: a blasztocöl teljesen kitölti az embriót, jól elkülöníthető trophoctoderm-el és ICM-al (12-13. kép).
4. Kiterjedt blasztociszta: a blasztocöl térfogata nagyobb, mint a korai embrió átmérője (215-280 μm) és a ZP elvékonyodik (14. kép).
5. Hatchingelődő blasztociszta: a trophoctoderma elkezd kitüremkedni a zónán (15-17. kép).
6. Hatchingelődött blasztociszta: a blasztociszta teljesen elhagyja a ZP-t (18-19. kép).



6. kép Morula



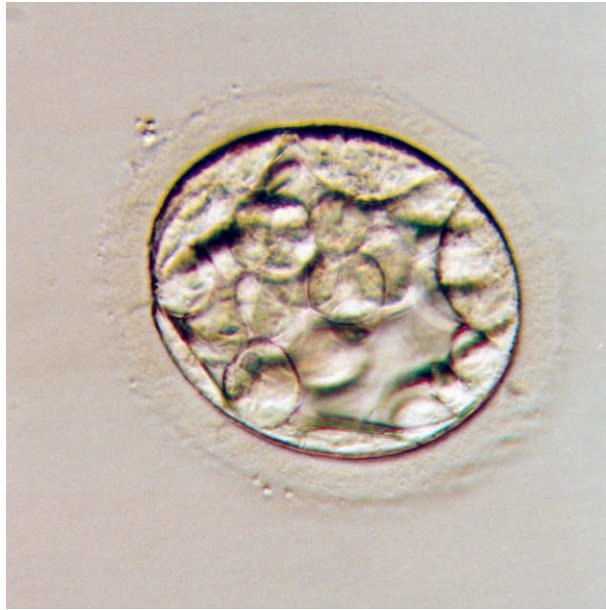
7. kép Morula



8. kép Korai blasztociszta



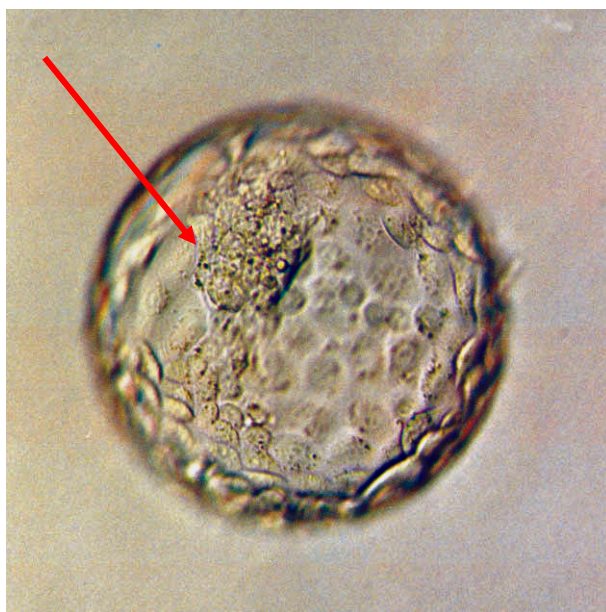
9. kép Korai blasztociszta



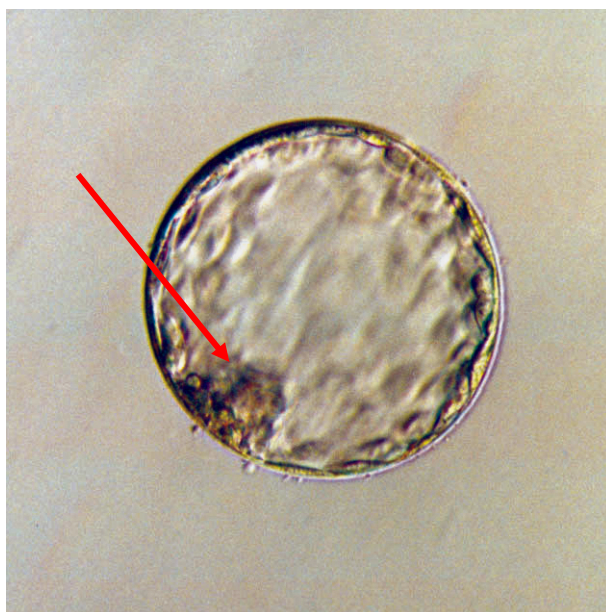
10. kép Blasztociszta



11. kép Kiterjedt blasztociszta



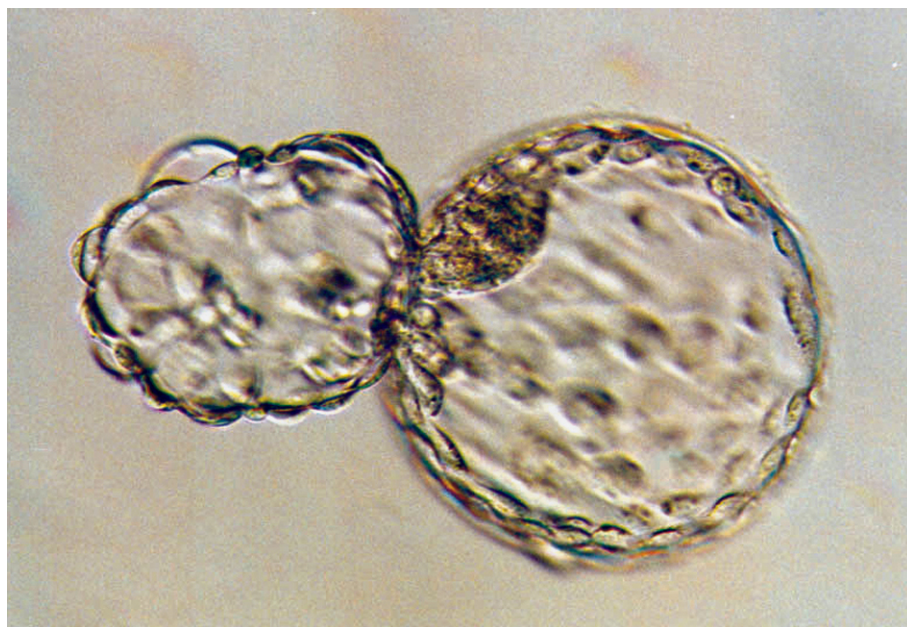
12. kép Blasztociszta – inner cell mass



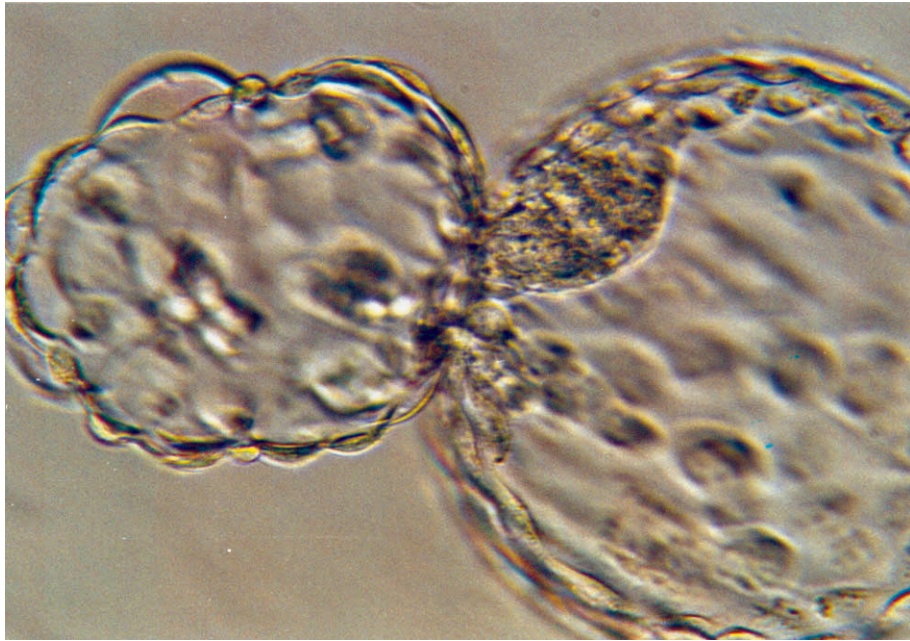
13. kép Blasztociszta – inner cell mass



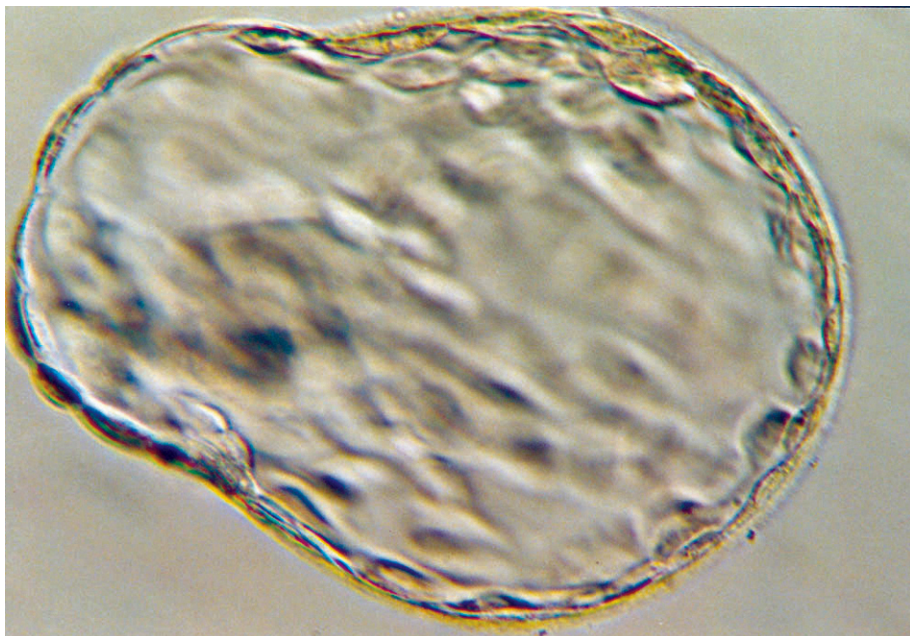
14. kép A hatchingelődés kezdeti stádiuma



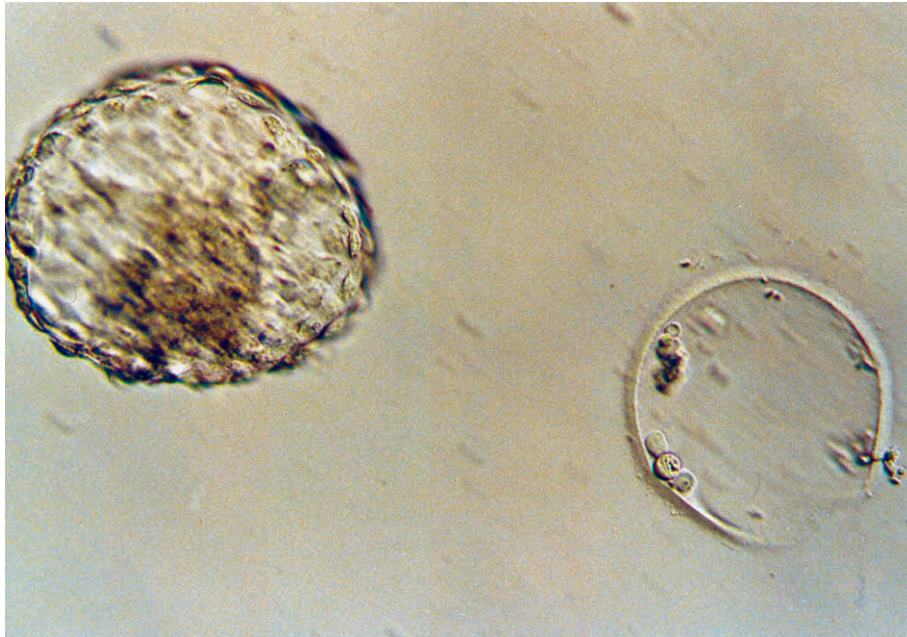
15. kép Hatching



16. kép Hatching



17. kép Hatching



18. kép Hatchingelődött blasztocisza és az üres zona pellucida



19. kép Üres zona pellucida

Az ICM értékelése

- A. Szorosan tömörült, sok sejt
- B. Laza csoport, közepes mennyiségű sejt
- C. Nagyon kevés sejt

Trophectoderma értékelése

- A. Sok sejt hozzátapadva az epitheliumhoz
- B. Kevés sejt lazán kapcsolódva az epitheliumhoz
- C. Nagyon kevés sejt

A legideálisabb blasztociszta, melynek legnagyobb a megtapadási valószínűsége a következő ismérvekkel rendelkezik: egyosztatú, nagymértékben üregesedett vagy kiterjedt blasztociszta az ötödik napra, ahol jól elkülöníthető az ICM, szorosan felfekvő trophoctoderm réteg látható, sarló alakú sejtekkel, vékony a ZP, magas a teljes sejt szám ha áttekintjük a blasztociszta összes síkját a felszíntől a teljes mélységig (Bongso, 1999). A jó minőségű blasztociszta teljes sejt száma a publikált adatok szerint 150 és 200 közé esik az ötödik napon.

A blasztociszták transzfere G 2.2 táptalajból történt.

A transzferált blasztocisztáknál nem alkalmaztuk a teljes ZP lebontást.

Az embrió transzfereket Frydman, vagy TDT katéterrel végeztük.

A petesejt nyerést követő 14. napon szérumbéta hCG vizsgálattal győződünk meg a terhesség létrejöttéről. Transzvaginális ultrahang vizsgálatot a petesejtvétel utáni 21. napon végeztük el.

B.3. EREDMÉNYEK

Az 593 IVF ciklus során összesen 4959 petesejtet (átlagosan 8,4) aspiráltunk, melyek közül 4215 volt érett (MII.) állapotban (85 %).

A megtermékenyülési arány az MII. petesejtekre vonatkoztatva 76 % lett (3191) (7. ábra). Triploid megtermékenyülés 1 %-ban fordult elő.

Morula, blasztociszta állapotig az osztódási arány 58,7 % volt.

Az 574 embrió transzfer során összesen 1263 blasztocisztát ültettünk vissza (átlagosan: 2,2).

76 esetben az embrió transzfert a zigóták alacsony száma miatt a negyedik napon végeztük (13,2 %). 25 klinikai terhesség után (32,9%), 17 szülés történt (22,4 %).

472 esetben történt az embrió transzfer az ötödik napon (82,2 %). 189 terhesség jött létre (40,0 %). Ezt 132 esetben követte szülés (28 %).

26 esetben pedig a hatodik napon (4,5%), 11 klinikai terhességet regisztráltunk (42,3 %) melyből 3 végződött szüléssel (11,5 %) (VI. táblázat). Ezt a transzfer napot akkor választottuk, ha az ötödik napra nem fejlődött blasztociszta, de már a morula stádiumot (6-7. kép) elérték az embriók.

19 esetben egyáltalán nem fejlődött morula illetve blasztociszta (3,2 %), ezért embrió transzfert nem végeztünk.

Tehát összesen 574 esetből 225 alkalommal jött létre klinikai terhesség (39,2 %).

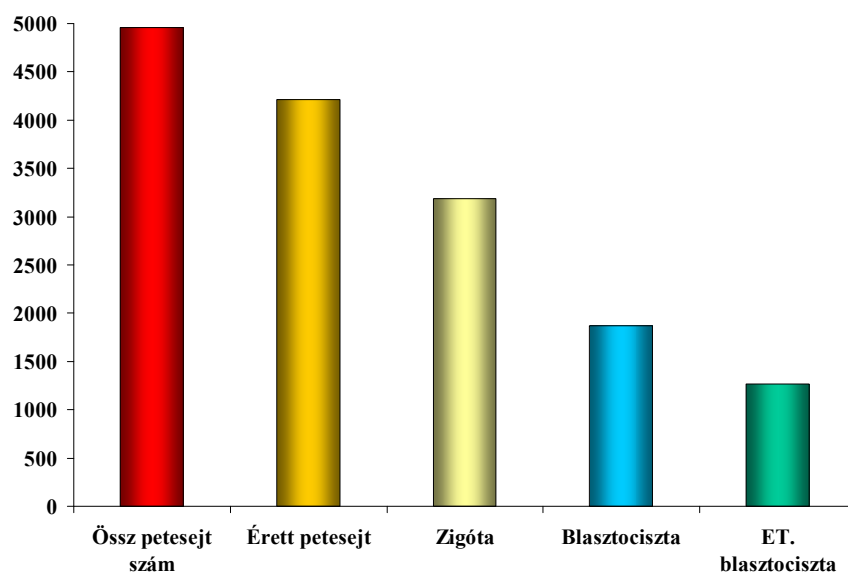
Szív működés 277 magzat esetében volt ultrahanggal látható.

Az esetek 32,4 %-a végződött spontán abortusszal (73/225).

Az esetek 7,6 %-ban morula stádiumban történő embrió transzfert végeztünk (44 eset), mely 5 terhességet (11,4 %) eredményezett.

A létrejött terhességek közül 110 egyes (72,4 %), 40 kettes (26,3 %) és 2 hármas (1,3 %) terhesség jött létre.

Az implantációs rátát 22,6 %-nak találtuk.



7. ábra. A létrejött blasztociszták a petesejt szám függvényében

VI. Táblázat. A késői embrió transzfer alkalmazása során létrejött terhességek és abból származó szülések anyagunkban

	Terhesség	Szülés
4. nap n=76	25 [32,9%]	17 [22,4%]
5.nap n=472	189 [40%]	132 [28%]
6.nap n=26	11 [42,3%]	3 [11,5%]

B.4. MEGBESZÉLÉS

Ismert tény, hogy a korai embrió fejlődési státuszának megfelelő környezet a petevezető, nem pedig a méh, amely a befogadó szerepre éretlen és nem biztosítja a megfelelő tápanyag szükségletet. A méhbe természetes körülmények között az embrió csak a kompaktálódás után jut be (Croxatto, 1978). Bavister (Bavister, 1995) patkány kísérletei egyértelműen bizonyították a különbséget a korai embrió, illetve morula, vagy blasztociszta méhbe való helyezése után elért terhességi eredményekben.

Az öt napos tenyésztés során azon embriók, amelyeknek fejlődési potenciálja alacsony, kiválaszthatók és kizárhatók (Bolton, 1989, Dawson, 1995), hiszen az embrionális genom aktiválódása megkezdődik, illetve néhány kromoszomálisan abnormális embrió nem fejlődik tovább (Munné, 1995).

Szekvenciális szérum mentes táptalaj használata nem az egyetlen út arra, hogy a zigótákat nagy hatékonysággal blasztociszta állapotig neveljük. Elkerülhető a szérum albuminnal, esetleg állati sejtvonallal bevitt infekciók lehetősége is. Az így létrejött blasztocisztáknak magasabb az implantációs aránya, mint a korai embrióknak, így emelhető az IVF sikeressége. A magasabb implantációs arány miatt csökkenthető az embrió transzferre kerülő embriók száma, így csökken a hármas és többes terhességek aránya.

IV. GYAKORLATI KÖVETKEZTETÉSEK

A. A LÉZER ASSZISZTÁLT HATCHING

- Az asszisztált hatching nem emeli a terhességi és implantációs arányt, ha a páciens 38 év alatti és az első IVF programjáról van szó,
- de a LAH emeli a terhességi és implantációs sikerarányt többszöri sikertelen IVF után
- a LAH előnye nem tisztázott még teljesen, az emelkedett anyai kor, a vastag ZP és a fagyasztás után felengedett embriók esetén
- a LAH leegyszerűsíti, felgyorsítja, és biztonságosabbá teszi a blasztomér biopszia végzését
- LAH végzése után nem találtunk alacsonyabb embrió továbbfejlődési arányt a Szent János Kórház Budai Meddőségi Centrumának anyagában
- a LAH végzésekor elkerüljük a fizikai érintését az embriónak, nem tesszük ki toxikus hatásnak. Az eljárás könnyen kivitelezhető, időkímélő, nagy hatékonyságú és könnyen reprodukálható módszer
- a LAH költségkímélő, nem szükséges hozzá hosszú évek embriológiai gyakorlata
- a megszületett gyermekek egyedülálló utánvizsgálata egyértelműen bizonyítja a LAH módszer veszélytelenségét, biztonságát

B. BLASZTOCISZTA KULTÚRA

- A Gardner féle szérumentes szekvenciális táptalajjal biztonságosan lehet életképes embriókat létrehozni, amennyiben megfelelő környezetet tudunk biztosítani az embrió fejlődéséhez.
- A hosszú tenyésztési idő alatt jobban lehet szelektálni az embrió transzferre kerülő embriókat, mivel a genetikailag hibás embriók túlélése valószínűtlenebb.
- Természetes körülmények között az osztódó és fejlődő embrió az ötödik napon (vagyis a ciklus 20. napján) jut a méhüregbe, amikor a méh nyálkahártyájának fejlettsége és a blasztociszta fejlettsége szinkron állapotban van. Így ha az ötödik napon blasztociszta állapotban juttatjuk az embriót a méhüregbe, sokkal jobb eredményeket várhatunk, mintha két, vagy három napos embriót juttatunk oda, amikor a méh nyálkahártya állapotának és az embrió fejlettségének aszinkronitása áll fent.
- Blasztociszta transzfer esetén nagyobb valószínűséggel elkerülhető az abnormális szülői genom öröklése ICSI után.
- A blasztociszta egyszerű mikroszkópos vizsgálatával megfigyelhető jellemzők alapján kiválogatható az életképebb embrió.
- Több idő áll rendelkezésre a préimplantációs genetikai vizsgálat kivitelezésére.
- A fagyasztás – felengedés után több idő marad az embrió továbbfejlődésének ellenőrzésére.
- A blasztociszta kultúra módszere csökkenti az idő intervallumot az
- embrió továbbfejlődés és a nyálkahártyába való implantáció ideje között, és ezáltal csökken a nem kívánatos faktorok hatása az embrió-szülő vonatkozásában.

V./A IRODALOMJEGYZÉK

ABRAMCZUK J, SOLTER D, KOPROWSKI H.: The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Devel Biol* 1977; 61: 378-83.

ANTINORI S, VERSACI C, FUHRBERG P, et al.: Seventeen births after the use of an erbium:YAG laser in the treatment of male factor infertility. *Hum Reprod* 1994; 9: 1891-6.

ANTINORI S, PANCI C, SELMAN H A et al.: Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in human. *Hum Reprod* 1995; 3: 101-5.

ANTINORI S, SELMAN HA, CAFFA B, et al.: Zona opening of human embryos using a noncontact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. *Hum Reprod* 1996; 11: 2488-92.

ASCH RH, ELLESWORT LR, BALMACEDA JP, WONG PC.: Pregnancy after translaparoscopic gameta intrafallopian transfer. *Lancet* 1984; 2: 1034-5.

BARNES D, SATO G.: Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* 1980; 102: 255-70.

BATT PA, GARDNER DK, CAMERON AWN.: Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fert Devel* 1991; 3: 601-7.

BAVISTER BD.: Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 91-148.

BOLTON VN, HAWES SM, TAYLOR CT and PARSONS JH.: Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates and development to blastocyst. J In Vitro Fertil Embryo Transfer 1989; 30-5.

BOLTON VN, WREN ME, PARSON JH.: Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. Fertil Steril 1991; 55: 830-2.

BONGSO A NG SC, FONG CY, ANANDAKUMAR C, MARSHALL B, EDIRISINGHE R, RATMANS.: Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tuba cell coculture. Fertil Steril 1992; 58: 569-74.

BONGSO A, FONG CY, MG SC and RATMAN JH.: Blastocyst transfer in human in vitro fertilisation: the use of embryo coculture. Cell Biol Int 1994; 18: 1181-9.

BONGSO A: Handbook on blastocyst culture. Sydney Press Indusprint (S) Pte Ltd. 1999; Ed: Ariff Bongso D. Sc, PhD.

BRAUDE PR, BOLTON VN, MOORE S.: Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. Nature 1988; 332: 459-61.

CASSLEN BG.: Free amino acids in human uterin fluid. Possible role of high taurine concentration. J Reprod Med 1987; 32: 181-4.

COHEN J, ELSNER C, KORT H. et al.: Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. Hum Reprod 1990; 5: 7-13.

COHEN J, ALIKANI M, TROWBRIDGE J, et al.: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. Fertil Steril 1992; 7: 685-91.

COONEN E, HARPER JC, RAMAEKERS FCS, DELHALTY JD, HOPMAN AH, GERAEDTS JP, HANDYSIDE AH: Presence of chromosomal mosaicism in abnormal preimplantation embryos detected by fluorescent in situ hybridisation. *Hum genet* 1994; 54: 609-15.

CROXATTO HB, ORTIZ ME, DIAZ S et al.: Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 132: 629-34.

DAWSON KJ, CONAGHAN J, OSTERA GR et al.: Delaying transfer to the third day post-insemination, to select non-arrested embryo, increases development to the fetal heart stage. *Hum Reprod* 1995; 10: 177-82.

DE KRETZER D, DENIS P, HUDSON B: Transfer of human zygote. *Lancet* 1973; 2: 728-9.

DELHANTY JD, HARPER JC, Ao A, HANDYSIDE A, WINSTON R.: Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997; 99: 755-60.

DEVROEY P, BRAECKMANS P, SMITZ J, VANWAESENBERGHE L, WISANTO A, VAN STEIRTEGHEM L, HEYTENS L, CAMU F.: Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* 1986; 1: 1329.

DORLAND M, GARDNER DK, TROUNSON A.: Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in vine embryos. *J Reprod Fertil Abstract Series* 1994; 13: 70.

EDWARDS RG, SURANI MAH: The mrimate blastocyst and its environment. *Uppsala J Med Sci* 1978; 22: 39-50.

EDWARDS LE, WILLIAMS DA, GARDNER DK. (1998) Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids. *Mol Reprod Devel*; 50: 434-42.

EDWARDS RG, BEARD HK.: Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts? Hum Reprod 1999; 14: 1-4.

EVSIKOV S, VERLINSKY Y: Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. Hum Reprod 1998; 13: 3151-5.

FITZGERALD-SCOTT L, SUNDARAM SG, SMITH S.: The relevance and use of mouse embryo bioassay for quality control in an assisted reproductive technology program. Fertil Steril 1993; 60: 559.

FLEMING R, ADAM AH, BARLOW DH, BLACK WP, MACNAUGHTON MC, COUTTS JRT.: A new systematic treatment for infertile woman with abnormal hormone profiles. Br J Obstet Gynaecol 1982; 89: 80-3.

GARDNER DK, LANE M.: Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. Biol Reprod 1993; 48: 377-85.

GARDNER DK, LANE , SPITZER A, BATT PA.: Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. Biol Reprod 1994; 50: 390-400.

GARDNER DK, LANE M.: Alleviation of the „2-cell block” and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. Hum Reprod 1996; 11: 2703-12.

GARDNER DK, LANE MW, LANE M.: Development of the inner cell mass in mouse blastocysts is stimulated by reducing the embryo: incubation volume ratio. Hum Reprod 1997; 12, Abstract book 1: 132.

GARDNER DK, LANE M.: Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. Hum Reprod 1998/a; 13(S3): 148-59.

GARDNER DK, SCHOOLCRAFT WB, WAGLEY L et al.: A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in-vitro fertilization. Hum Reprod 1998/b; 13: 3334-40.

GARDNER DK, SCHOOLCRAFT WB.: In-vitro culture of human blastocyst. In Towards Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond 1999. Eds. Jansen, R. and Montimer D, Parthenon Press, Carnforth, 1999/a: pp 378-88.

GARDNER DK, LANE M, JOHNSON J, WAGLEY L, STEVENS J, SCHOOLCRAFT WB.: Reduced oxygen tension increases blastocyst development, differentiation and viability. Fertil Steril 1999/b; 72: (Suppl 1): O-079.

GARDNER DK, LANE MW, LANE M.: EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. Mol Reprod Devel 2000/a; 57: 256-61.

GARDNER DK, LANE M.: Recombinant human serum albumin and hyaluronan can replace blood-derived albumin in embryo culture media. Fertil Steril 2000/b; 74: (Suppl 1): O-086.

GARDNER DK, LANE M.: Embryo culture. Textbook of Assisted Reproductive Techniques Ed: Gardner KG, Weissman A, Howles CM, Shoham Z., Martin Dunitz Ltd, London 2001; pp: 203-22.

GERMOND M, NOCERA D, KORT H et al.: Microdissection of mouse and human zona pellucida using 1.48-microns diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. Fertil Steril 1995; 64: 604-11.

GERRIS J, DE NEUBOURG D, MANGELSCHOTS K, et al.: Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. Hum Reprod 1999; 14: 2581-7.

GODKE RA, BERTEN DD and BURLEIGH DW.: A method for zona pellucida drilling using a compact nitrogen laser. Proceedings of the 7th World Congress on Human Reproduction, Kirjapaino Tapo Oy, Helsinki, Finland 1990; Abstract 258.

GONZALES DS, JONES JM, PINYOPUMINTR, et al.: Trophoctoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocyst. Hum Reprod 1996; 11: 2739-45.

GORDON JW, TALANSKY BE: Assisted fertilisation by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. J Exp Zool 1986; 239: 347-54.

GRAY CW, MORGAN PM, KANE MT.: Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. J Reprod Fertil 1992; 94: 471-80.

HARDY K, SPANOS S.: Culture and growth factors for embryos. The human blastocyst 2001, Alpha Workshop, Genk 2001, Abstract book

HARPER JC, COONEN E, HANDYSIDE AH, WINSTON RM, HOPMAN AH, DELHANTHY JD.: Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic, preimplantation human embryos. Prenatal Diagn 1995; 15: 41-9.

HEAPE W.: Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. Proc R Soc 1891; 48: 457.

HIRAO Y, YANAGIMACHI R.: Detrimental effect of visible light on meiosis of mammalian eggs in vitro. J Exp Zool 1978; 206: 365-70.

HUISMAN GJ, FAUSER BCJM, EIJKEMANS MJC, PIETERS MHEC.: Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. Fertil Steril 2000; 73: 117-22.

JANNY L, MENEZO YJ.: Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 17-31.

JANSEN RPS, ANDERSON JC.: Catheterization on the fallopian tube from the vagina. *Lancet* 1987; 2: 309-10.

JANSEN RPS, ANDERSON JC, SUTHERLAND PD.: Non operative embryo transfer to the Fallopian tube. *N Engl J Med* 1988; 319: 288-91.

KANE MT.: Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocyst in culture. *J Reprod Fertil* 1983; 69: 555-8.

KANYÓ K, KONC J.: Non contact laser hatching combined with day 3 embryo transfer 11th World Congress on In Vitro Fertilisation and Human Reproductive Genetics. 1999; Sydney, Australia, Abstract 100.

KANYÓ K, KONC J.: A follow-up study of children born after non-contact laser assisted hatching at 96 deliveries, 134 babies. 16th Annual Meeting of the ESHRE 2000, Bologna, Italy; Abstract: O-156.

KANYÓ K, KONC J.: Első hazai tapasztalatok lézerrel végzett hatchinggel. *Magy Nőorv L* 2002; 65 (1): 3-5.

KHALIFA EAM, TUCKER MJ, HUNT P.: Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992; 7: 532-6.

KOLA I, SATHANATHAN AH, GRAS L.: Chromosomal analysis of preimplantation mammalian embryos. In: Trounson A, Gardner DK, Eds. *Handbook of in vitro fertilisation*, 2nd ed. 1993; Boca Raton: CRC Press: 173-93.

KONC J, KANYÓ K.: Mechanical or laser hatching? XVI. FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics 2000; Washington D.C., USA.: Abstract: FC3.01.04.

LANE M, GARDNER DK.: Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. Hum Reprod 1992; 7: 558-62.

LANE, M, GARDNER DK.: Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. J Reprod Fert 1994; 102: 305-12.

LANE M, GARDNER DK.: Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. J Reprod Fertil 1997; 109: 153-64.

LANE M, BALTZ JM, BAVISTER BS.: Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen (Na^+/H^+) antiporter. Biol Reprod 1998; 59: 1483-90.

LANZENDORF S, MALONEY M, ACKERMAN S, ACOSTA A, HODGEN G.: Fertilizing potential of acrosome-defective sperm following microsurgical injection into eggs. Gamete Res 1988; 19: 329-37.

LAW-KING A, TROUNSON A, SATHANANTHAN AH, KOLA I.: Fertilization of human oocytes by micro-injection of a single spermatozoa under zona pellucida. Fertil Steril 1987; 48: 637-42.

LEESE HJ.: The formation and function of oviduct fluid. J Reprod Fertil 1988; 82: 843-56.

LENZ S, LEETON J.: Evaluating the possibility of uterine transfer by ultrasonically guided transabdominal puncture. J In Vitro Fert Embryo Transf 1987; 4: 18-22.

LESNEY P, KILLICK SR, TETLOW RL.: Uterine junctional zone contractions during assisted reproduction cycles. Hum Reprod Update 1998; 4: 440-5.

LIU HC, COHEN J, ALIKANI M, NOYES N, ROSENWAKS Z.: Assisted hatching facilitates earlier implantation. Fertil Steril 1993; 60: 871-5.

MALTER H, SCHIMMEL T, CALDERON G, COHEN J.: Use of lasers in assisted hatching. Annual Review of preimplantation embryology 2001; Cancun, Mexico Abstract book: 147-55.

MAREK D, LANGLEY M, GARDNER DK, et al.: Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 1999; 72: 1035-40.

MÁTYÁS SZ, RAJCZY K, KORPONAI E, BERNARD A, KAÁLI SG.: Az asszisztált hatching alkalmazásával szerzett hazai tapasztalataink. Magy Nőorv L 1997; 60 (3): 171-3.

MÁTYÁS SZ, RAJCZY K, BERNARD A, KRIZSA F, KOVÁCS T, KULIN S, MENYHÁRT R, GÁTI I, KAÁLI SG.: In vitro blasztocisza tenyésztéssel szerzett tapasztalataink. Magy Nőorv L 2000; 63 (6): 435-8.

MCKIERNAN SH, BAVISTER BD.: Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. In vitro cell dev biol 1992; 28A: 154-6.

MEHTA TS, KIESSLING AA.: Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. Biol Reprod 1990; 43: 600-6.

MENEZO YJR.: Amino constituents of tubal and uterine fluids of the oestrous ewe: comparison with blood serum and ram seminal fluid. In Hafez ESE, Thibault CG, (Eds.) The biology of spermatozoa 1972; New York: Basel Press pp: 174-81.

MENEZO YJR, GUERIN JF and CZYBA JC.: Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. Biol Reprod 1990; 42: 301-6.

MENEZO Y, HAZOUT A, DUMANT M et al.: Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. Hum Reprod 1992; 7: 101-6.

MENEZO YJ, CHOUTEAU J, GIRARD A, VEIGA A.: Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans. Fertil Steril 1999; 72: 221-4.

MUNNÉ S, GRIFO J, COHEN J.: Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: multiple-probe FISH study. Am J Hum Genet 1994; 55: 150-9.

MUNNÉ S, ALIKANI M, TOMKIN G, GRIFO J, COHEN J.: Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertil Steril 1995; 64: 382-91.

MUNNÉ S, MAGLI C, ADLER A, WRIGHT G, de BOER K, MORTIMER D, TUCKER M, COHEN J, GIANAROLI L.: Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. Hum Reprod 1997; 12: 780-4.

MUNNÉ S, COHEN J.: Chromosome abnormalities in human embryos. Hum Reprod Update 1998; 4: 842-55.

NEEV J, TADIR Y, HO P, et al.: Microscope-delivered UV laser zona dissection: principles and practices. J Assist Reprod Genet 1992; 9: 513-23.

NODA Y, GOTO Y, UMAOKA Y, SHIOTANI M, NAKAYAMA T, MORI T.: Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. Fertil Steril 1994; 62: 1022-6.

OBRUCA A, STROHMER H, SAKKAS D et al.: Use of lasers in assisted fertilisation and hatching. Hum Reprod 1994; 9: 1723-6.

OBRUCA A, STROHMER H, BLASCHITZ A, SCHÖNICKLE E, DOHR G, FEÍCHTINGER W.: Ultrastructural observation in human

oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an Er: YAG laser. Hum Reprod 1997; 12: 2242-5.

OLIVENNES F, HAZOUT A, LELAIDIER C et al.: Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. Hum Reprod 1994; 9: 2367-73.

PALANKER D, OHAD S, LEWIS A et al.: Technique for cellular microsurgery using the 193 nm Excimer laser. Laser Surg Med 1991; 11: 589-96.

PALERMO G, JORIS H, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM AC.: Prenancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17-8.

PAPP Z.: Klinikai Genetika, Szerk.: Dr. Papp Zoltán. Golden Book Kiadó Budapest, 1995; 374. old.

PHILLIPS KP, LEVEILLE MC, CLAMAN P, BALTZ JM.: Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos. Hum Reprod 2000; 4: 896-904.

PICKERING SJ, BRAUDE PR, JOHNSON MH, CANT A, CURRIER J.: Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. Fertil Steril 1990; 54: 102-8.

PORTER RN, SMITH W, CRAFT IL, ABDULWAHID NA, JACOBS HS.: Induction of ovulation for in vitro fertilization using buserelin and gonadotropins. Lancet 1984; 2 : 1284-85.

QUINN P, HARLOW GH.: The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. J Exp Zool 1978; 206: 73-80.

RINK K, DÉLACRÉTAZ G, SALATHÉ RP, et al.: Non-contact microdrilling of mouse zona pellucida with an objective- delivered 1.48 μm diode laser. Lasers Surg Med 1996; 18: 52-62.

ROCK J, MENKLIN MF.: In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. Science 1944; 100: 105-7.

SANDALINAS M, SADOWY S, CALDERON G, ESCUDERO T, ALIKANI M, COHEN J, MUNNÉ S.: Survival of chromosome abnormalities to blastocyst stage. Abstract of the 16 Meeting of ESHRE, Bologna, Hum Reprod 2000; 15 (Abstract book 1): (O-027).

SCHENK S.: Das Säugethiereie künstlich befruchtet ausserhalb des Mutterthieres. Mitt Embr Inst K K Univ 1880; Wien; 1: 107.

SCHIEWE MC, ARAUJO JR, ASCH RH, BALMACEDA JP.: Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. J Ass Reprod Genet 1995/a; 12: 2-7.

SCHIEWE MC, HAZELEGER NL, SCHIMENTI C, BALMACEDA JP.: Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. Fertil Steril 1995/b; 63: 288-94.

SCOTT LA, SMITHS S.: The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. Hum Reprod 1998; 13: 1003-13.

SHOUKIR Y, CHARDONNENS D, CAMPANA A et al.: Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? Hum Reprod 1998; 13: 2869-73.

STEEVES TE, GARDNER DK.: Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. Biol Reprod 1999; 61: 731-40.

STEPTOE PC, EDWARDS RG and PURDY JM.: Human blastocysts grown in culture. Nature 1971; 229: 132-3.

STEPTOE PC, EDWARDS RG.: Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 1978; 2: 366-70.

STROHMER H and FEICHTINGER W.: Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilisation program. *Fertil Steril* 1992; 58: 212-4.

SZILÁGYI A, MÁNFAI Z, WERLING J, WILHELM F, BÓDIS J, GÁCS E, SZABÓ I.: Transcervicalis transuterinalis gameta transfer (TCTUGT) szerepe az asszisztált reprodukív technikákban. *Magy Nőorv L* 1995; 58: 345-7.

TADIR Y, WRIGHT WH, VAFA O et al.: Micromanipulation of sperm by a laser generated optical trap. *Fertil Steril* 1989; 52: 870-3.

TADIR Y, WRIGHT WH, VAFA O, LIAW LH, ASCH R, BERNIS MW.: Micromanipulation of gametas using laser microbeams. *Hum Reprod* 1991; 6: 1011-6.

TADIR Y.: Ten years of laser-assisted gamete and embryo manipulation. *Contemporary OB/GYN* 1998; 9: 126-50.

TAYLOR DM, RAY PF, AO A et al.: Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three-to four-cell stage. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 442-8.

THOMPSON JG, GARDNER DK, PUGH PA et al.: Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation of ovine embryos. *Biol Reprod* 1995; 53: 1385-91.

VAN BLERKOM J.: Developmental failure in human reproduction associated with chromosomal abnormalities and cytoplasmic pathologies in meiotically mature oocytes. In: Van Blerkom J, (ed.) *In the biological basis of early human reproductive failure* 1994; New York: OUP pp: 283-326.

VAN WINKLE LJ.: Amino acid transport in developing animal oocytes and early conceptuses. *Biochem Biophys Acta* 1988; 947: 173-208.

VEIGA A, BOISO I.: The blastocyst: a tool for genetic studies. The Human Blastocyst 2001. Alpha Scientist Workshop 2001; Genk, Abstract book.

WALKER SK, HEARD TM, SEAMERK RF.: In vitro culture of sheep embryos without coculture: success and perspectives. Theriogenology 1992; 37: 111-26.

V./B A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG JEGYZÉKE

ELŐADÁSOK

1. KONC J, KANYÓ K, ZSOLNAI CS.: Transvaginal-transmyometrial embryo transfer under ultrasound guidance: Towako Method. IVth World Congress of ISUOG 1994; Budapest.
2. KONC J, KANYÓ K, ZSOLNAI CS.: In vitro fertilizációval szerzett tapasztalataink polycystas ovarium szindrómánál. IVF Workshop 1995; Pécs.
3. KANYÓ K, KONC J, ZSOLNAI CS.: Our policy for prevention of ovarium hyperstimulation syndrome. "Ovarium Stimulation and Hyperstimulation" the Satellite Symposion of the IXth Word Congress on IVF and Assisted Reproduction 1995; Budapest.
4. KONC J, KANYÓ K.: Experiences with transvaginal-transmyometrial embryo transfer under ultrasound guidance, Towako-method. Magyar Bajor Baráti Társaság , Tudományos Ülése 1995; München.
5. KANYÓ K.: MiniVidas alkalmazása egy IVF központban. Diagnosticum Rt. Laboratóriumi termékbemutató és symposium 1995; Budapest.
6. KANYÓ K, KONC J, ZSOLNAI CS, HUNKA R.: Az in vitro fertilizáció eredményességének javítása harmadik napos embrió transzferrel. " Családcentrikus szülészet " I. Kongresszusa 1996; Budapest.
7. KANYÓ K és munkatársai: IVF eredményeink javítása III. napos embryo transzferrel. "Az asszisztált reprodukció aktuális kérdései Magyarország" II. Symposium and Workshop 1996; Pécs.

8. KONC J, KANYÓ K.: Törekvéseink (filozófiánk) az IVF sikerességének javítására a micromanipuláció indikációjának kiterjesztésével és a "halasztott" embryotranszfer alkalmazásával . Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, III. Symposium és Workshop 1997; Pécs.
9. KANYÓ K, KONC J.: A micromanipuláció kiterjesztésének és a késői embryotranszfer alkalmazásának embryologiai szempontjai. Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, III. Symposium és Workshop 1997; Pécs.
10. KANYÓ K, KONC J, KOVÁCS J.: Micromanipuláció a Szent János Kórházban (Videofilm), Noszkay emlékszimposium 1997; Budapest.
11. KONC J, KANYÓ K, KOVÁCS J, MÁRTA E, HUNKA R.: Az IVF eredményessége és a micromanipuláció. Magyar Nőorvos Társaság, XXVI. Nagygyűlése 1998; Pécs.
12. KANYÓ K, KONC J, KOVÁCS J.: Áthatolás a zona pellucidán, Videófilm, 8 perc. Magyar Nőorvos Társaság XXVI. Nagygyűlése 1998; Pécs.
13. KONC J, KANYÓ K.: Assisted hatching by non-contact laser. Bajor-Magyar Baráti Társaság 1998; Budapest Visegrád.
14. KONC J, KANYÓ K.: Laser hatchinggel szerzett első magyarországi tapasztalatok. Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, IV. Symposium 1998; Pécs.
15. KANYÓ K, KOVÁCS J, KONC J, MÁRTA E.: Terhesség cryoconservált hereszövetből kinyert spermiummal, Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, IV. Symposium 1998; Pécs.
16. KANYÓ K, KOVÁCS J, KONC J.: Mikromanipuláció a petesejten és embrión. Szent János Kórház Centenárium Tudományos Ülések VIII. 1998; Budapest.

17. KONC J, KOVÁCS J, KANYÓ K.: A LASER szerepe az embriológiában Szent János Kórház Centenárium Tudományos Ülések VIII. 1998; Budapest.
18. KANYÓ K.: Recombináns FSH és az embrió minőség, SERONO Szimpózium: Új Korszak Kezdeté a Meddőség Kezelésében 1999; Budapest.
19. KONC J, KANYÓ K.: Puregon administration in IVF cycles, at low responders, above the age of 37 years. 11th World Congress on In Vitro Fertilisation and Human Reproductive Genetics 1999; SYDNEY, Abstract: O-054.
20. KANYÓ K, KONC J.: Non contact laser hatching combined with day 3 embryo transfer. 11th World Congress on In Vitro Fertilisation and Human Reproductive Genetics 1999; SYDNEY, Abstract: O-100.
21. KANYÓ K, KONC J.: Lézer hatchinggel szerzett tapasztalataink. MART II. Nemzeti Kongresszusa 1999; Debrecen.
22. KONC J, KANYÓ K, MÁRTA E, ZEKE J. A 40 év felettiek IVF programja. Jelen lehetőségeink és korlátaink mindennapi gyakorlatunkban. Az Asszisztált Reprodukció időszerű kérdései, V. Symposium 1999; Pécs.
23. KANYÓ K, KONC J, MÁRTA E, ZEKE J.: Blastocysta transzferrel szerzett első tapasztalataink. Az Asszisztált reprodukció időszerű kérdései, V. Symposium 1999; Pécs.
24. KONC J, KANYÓ K.: IVF above forty. V. Bajor-Magyar Baráti Találkozó – szimpózium 1999; FERRING, Bad Reichenhall.
25. KANYÓ K, KONC J.: First experiences obtained by blastocyst transfer. V. Bajor-Magyar Baráti Találkozó – szimpózium 1999; FERRING, Bad Reichenhall.

26. KANYÓ K, KONC J.: Comparison of the non-contact laser hatching's result with the mechanical hatching's result. VIth International Symposium on Assisted Reproduction 2000; Pécs.
27. KANYÓ K, KONC J.: A follow-up study children born after non-contact laser assisted hatching at 96 deliveries, 134 babies. 16th Annual Meeting of the ESHRE 2000; Bologna, Italy, Abstract: O-156.
28. KANYÓ K, KONC J.: First hungarian Pregnancies-Deliveries after ICSI using originally unmoving spermatids obtained from cryopreserved testicular tissue. XVI. FIGO World Congress 2000; Washington DC, USA, Abstract: FC4.16.02.
29. KONC J, KANYÓ K.: Mechanical or Laser Hatching ? XVI. FIGO World Congress 2000; Washington DC, USA, Abstract: FC3.01.04.
30. MÁRTA E, KONC J, KANYÓ K, ZEKE J, ÚJVÁRI E.: Dupla embrió transzferrel szerzett első hazai tapasztalatok. Családcentrikus Szülészet III. Kongresszusa 2001; Salgótarján.
31. KANYÓ K, KONC J, MÁRTA E, ZEKE J.: A lézer szerepe a mikromanipulációs eljárásokban. MART III. Nemzeti Kongresszusa 2001; Visegrád.
32. KANYÓ K.: Három év alatt szerzett tapasztalataink a lézer mikromanipuláció alkalmazásával. Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, VII. Symposium 2001; Pécs.
33. KONC J, KANYÓ K.: Investigations on double embryo transfer. The 17th World Congress on Fertility and Sterility 2001; Melbourne, Australia, Abstract: page: 163.
34. KANYÓ K, KONC J.: Follow-up study after non-contact laser hatching. The 17th World Congress on Fertility and Sterility 2001; Melbourne, Australia, Abstract: page: 49.

POSZTEREK

1. KANYÓ K, KONC J.: Mini Vidas rendszer használata in vitro fertilizációs ciklusokban és a betegek kivizsgálásában. Magyar Nőorvos Társaság XXV. Nagygyűlése 1994; Debrecen.
2. KANYÓ K, KONC J.: Harmadik napos embrió transzfer. "Az asszisztált reprodukció aktuális kérdései", MART I. Nemzeti Kongresszusa 1995; Budapest.
3. KANYÓ K, KONC J, MÁRTA E, HUNKA R.: ICSI from frozen - thawed sperm. ESHRE Campus'96, "Novel Trends in Reproductive Medicine" 1996; Budapest.
4. MÁRTA E, KANYÓ K, KONC J, KOVÁCS J, ZEKE J, KRISTON R, FENYVESI B.: TESE-ICSI programunk eredményessége. MART III. Nemzeti Kongresszusa 2001; Visegrád.
5. ELEKES T, KANYÓ K, SZABÓ J, POLGÁR Z, KONC J.: Dual Color FISH alkalmazása a praeembryonális aneuploidiák és a nemhez kötött kórképek praeimplantációs szűrésében. MART III. Nemzeti Kongresszusa 2001; Visegrád.
6. J. KONC, K. KANYÓ: Effect of double embryo transfer on the results. 12th World Congress on In Vitro Fertilization and Molecular Reproduction 2002; Buenos Aires, Argentina.
7. K. KANYÓ, J. KONC: An investigation of the safety of laser assisted hatching (follow up study). 12th World Congress on In Vitro Fertilization and Molecular Reproduction 2002; Buenos Aires, Argentina.
8. A. TÖRÖK, F. KILÁR, K. KANYÓ, M. REZELI, B. VILÁGHY: The electrophoretic patterns of follicular fluid and serum from woman pre-treated for IVF. 12th World Congress on In Vitro Fertilization and Molecular Reproduction 2002; Buenos Aires, Argentina.

IDÉZHETŐ ABSTRACT

1. KANYÓ K, KONC J.: A follow-up study children born after non-contact laser assisted hatching at 96 deliveries, 134 babies. 16th Annual Meeting of the ESHRE 2000; Bologna, Italy, Abstract: O-156.

KÖZLEMÉNYEK

1. KONC J, KANYÓ K.: Transvaginális-transmyometriális embryo transfer (Towako módszer). Magy Nőorv L 1995; 58: 211-3.

2. KANYÓ K, KONC J.: Sperma kezelési módszerek összehasonlítása in vitro fertilizációs ciklusoknál. Magy Nőorv L 1996; 59: 189-92.

3. KONC J, KANYÓ K.: Polycystás ovariumra utaló ultrahang lelet és az in vitro fertilizáció. Magy Nőorv L 1998; 61: 46-50.

4. KANYÓ K, KONC J, KOVÁCS J, MÁRTA E.: Szülés kriokonzervált hereszövetből kinyert mozdulatlan spermiummal végzett ICSI-t követően (Esetismertetés). Magy Nőorv L 1999; 62: 257-9.

5. ZEKE J, KANYÓ K, BALOG I, KONC J, LINTNER F.: Adnextorsio IVF-ET során létrejött terhességeknél. Magy Nőorv L 2001; 64: 447-9.

6. KANYÓ K, KONC J.: Investigations on double embryo transfer. IFFS 2001 Selected Free Communications, Melbourne, (Australia), Monduzzi Editore (International Proceedings Division); pp: 169-73.

7. KANYÓ K, KONC J.: Follow-up study after non-contact laser hatching. IFFS 2001 Selected Free Communications, Melbourne, (Australia). Monduzzi Editore (International Proceedings Division); pp: 153-7.

8. KANYÓ K, KONC J.: Első hazai tapasztalatok lézerrel végzett hatchinggel. Magy Nőorv L 2002; 65: 3-5.

9. REZELI M, VILÁGHY B, KILÁR F, KANYÓ K, TÖRÖK B, TÖRÖK A.: Significant differences in capillary electrophoretic patterns of follicular fluids and sera from woman pre-treated for in vitro fertilization. J Biochem Biophys Methods 2002; 53: 151-6.

I F: 1,218

10. K. KANYÓ, J. KONC: A follow-up study of children born after diode laser assisted hatching. Eur J Obst Gynecol Reprod Biol (közlésre elfogadva, 2003.)

I F: 0,884

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Konc János tanár úrnak, aki egész eddigi pályafutásom alatt segítette munkámat. Konc tanár úr mindvégig mellettem állt és bátorított, és minden támogatást megadott annak érdekében, hogy kutatási elképzeléseimet eredményesen valósíthassam meg.

Köszönöm Dr. Szilágyi András tanár úrnak, hogy elvállalta a témavezetést és tanácsaival segítette a disszertáció elkészítését.

Köszönettel tartozom Sebestyén Győzőnek és Michell Roulett-nak, akik lehetőséget biztosítottak számomra a tradicionális In Vitro Fertilizáció alapjainak elsajátítására Le Havre-ban és Magyarországon.

Nagy hálával gondolok Professzor Gordts-ra és Miet Vercruyssen-re, akik az ICSI technika elsajátításában voltak segítségemre.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom Professzor Dr. Szabó Istvánnak, aki kezdettől fogva figyelemmel kísérte szakmai működésemet és folyamatosan ellátott hasznos tanácsaival.